

Adoptivna celična terapija in limfociti T z izraženimi himernimi antigenskimi receptorji

Adoptive Cell Therapy and chimeric antigen receptor – T cells

Uroš Rajčević

Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana, Slovenija

Korespondenca/ Correspondence:

Uroš Rajčević, : uros.rajcevic@ztm.si

Ključne besede:

adoptivna celična terapija; CAR-T; TCR; TIL; imunoterapija

Key words:

adoptive cell therapy; CAR-T; TCR; TIL; immunotherapy

Prispelo: 13. 11. 2019
Sprejeto: 24. 3. 2020

Izvleček

Pri zdravljenju raka se trenutno uporabljajo pristopi kirurškega zdravljenja, radio- in kemoterapije ter različne kombinacije teh pristopov. Kot 'četrty steber' onkološkega zdravljenja se razvija imunoterapija. Revija Science je imunoterapijo raka že leta 2013 razglasila za 'preboj leta'. Terapije s protitelesi in citokini se uporabljajo že dlje, celična imunoterapija pa pridobiva na pomenu šele v zadnjih letih, še posebej po zaslugi adoptivne T-celične terapije (ATC). Terapije z adoptivnimi limfociti T, kar obravnava prispevek, delimo predvsem na terapije s tumor infiltrirajočimi limfociti (TIL) in terapije z limfociti T, ki so gensko spremenjeni bodisi s transgenimi T-limfocitnimi receptorji (*angl.* T-cell receptor, TCR) ali pa s himernimi antigenskimi receptorji (CAR). Vse te terapije so izrazito personalizirane in trenutno temeljijo na presaditvi avtolognih, t.j. bolnikovih lastnih celic. Terapevtiki se pripravijo za vsakega bolnika posebej, kar zelo vpliva na procese razvoja in izdelave ter tako na logistiko in stroške, ki so povezani s tem. Nov način terapij s CAR-T, ki je za določene bolezni trenutno tudi edini registrirani način ATC, povzroča revolucionarne premike pri razvoju takih naprednih terapevtikov, s tem pa tudi v klinični onkologiji. Terapija s CAR-T dosega izredne uspehe v klinični praksi zlasti v boju proti hematološkim oblikam raka, medtem ko pri zdravljenju bolnikov s solidnimi tumorji še ne. Hkrati pa zaradi velike kompleksnosti terapije težavo pri zdravljenju s CAR-T povzročajo pogosti, težki stranski učinki, ki lahko vodijo tudi v bolnikovo smrt. Z ustreznimi ukrepi lahko stranske učinke nadzorujemo in delno ublažimo. Terapija s CAR-T vstopa v Slovenijo s komercialno dostopnimi terapevtiki te vrste, na možnost ostalih adoptivnih celičnih terapij pa bo potrebno še počakati. V Sloveniji pa na tem področju razvijamo tudi lastno znanje in tehnologijo, zato upamo, da bodo novi učinkoviti načini zdravljenja čim prej dostopni čim širšemu krogu bolnikov.

Abstract

In cancer therapy, currently used approaches include surgery, radio- and chemotherapy and various combinations of these. Immunotherapy is emerging as the 'fourth pillar' of cancer therapy. Science Magazine declared cancer immunotherapy as a 'breakthrough of the year' in 2013. While antibody therapies and cytokines have been in use for a longer period of time, the cell immunotherapies are only gaining momentum in recent years, especially thanks to adoptive T-cell therapy (ATC). Adoptive T-cell therapy, which is subject of this article can be divided mostly to therapies with tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) and to therapies using T-cells genetically modified with transgenic T-cell receptors (TCR) or chimeric antigen receptors (CAR). All of these therapies are exclusively personalized and are at the moment based on the autologous transplant of the patient's own cells. Therapeutic cells are prepared for each patient individually, which carries a great impact on the processes of their development and production, as well as the logistics and costs involved. The new mode of therapies with CAR-T, for specific diseases at the moment the only registered mode of ATC, causes revolutionary breakthroughs in the development of such advanced therapeutics and, consequently in clinical oncology. CAR-T therapy is achieving an incredible success in clinical practice especially in combat against hematological

cancers, while the treatment of patients with solid tumours it has not been as successful. Along with that, due to great complexity of the CAR-T therapy, it is accompanied by frequent and severe side effects which can be fatal in worst cases. By adopting adequate measures, these effects can be controlled and partially mitigated. CAR-T therapy is being introduced to Slovenia through registered, commercially accessible therapeutics of this kind, while the access to other ATC is still pending. At the same time, in Slovenia in this field, we are developing our own knowledge and technology, hoping that new, efficient treatment modalities become accessible to a wider population of patients as soon as possible.

Citirajte kot/Cite as: Rajčević U. Adoptivna celična terapija in limfociti T z izraženimi himernimi antigenskiimi receptorji. *Zdrav Vestn.* 2020;89(7–8):398–407.

DOI: 10.6016/ZdravVestn.3006

1 Uvod

Pri raku imunski sistem bolnika omejuje onkogenezo in napredovanje rasti tumorjev, a igra pomembno vlogo tudi pri odzivu obstoječih tumorjev na protitumorsko zdravljenje, kar je povzeto v (1). Z namenom spodbuditi ali obnoviti sposobnost imunskega sistema, da lahko odstrani na specifičen način maligne celice, so razvili številne oblike protitumorske imunoterapije (2-4). Zato je aktiviranje lastnega imunskega sistema, da prepozna tumorske celice in jih uniči, eden ključnih ciljev imunoterapije raka. V literaturi se imunoterapija raka najpogosteje, a ne izključno, povezuje s (5): terapijo s protitelesi (6) in imunostimulacijskimi citokini (1), protitumorsko vakcinacijo (1,7-9) ter z adoptivnim celičnim zdravljenjem (1,5). Adoptivno celično zdravljenje pridobiva na pomenu v zadnjih letih, še posebej po zaslugi terapije z limfociti T, gensko spremenjenimi s himernimi antigenskiimi receptorji (CAR-T). S CAR gensko spremenjeni limfociti T s sintezo biološko združujejo funkcionalnosti humoralnega in celičnega imunskega odziva, kar sicer v naravi ne obstaja. Ta način terapij povzroča revolucionarne premike pri razvoju takih terapevtikov ter s tem tudi v klinični onkologiji. Prve tovrstne terapevtike so leta 2017 registrirali pri

Ameriški agenciji za hrano in zdravila (*angl.* Food and drug administration, FDA) in leta 2018 pri Evropski agenciji za zdravila (European medicines agency, EMA), zato so na voljo tudi že v Evropi. Stanje kliničnih študij kaže na to, da se bo obseg tovrstnih terapevtikov na trgu v prihodnjih letih hitro povečeval. Terapija s CAR-T dosegla izredne uspehe v klinični praksi zlasti pri hematoloških oblikah raka (10). Položaj je precej slabši pri zdravljenju bolnikov s solidnimi tumorji (11), med drugim zaradi mikrookolja, ki ni naklonjeno celicam CAR-T. Dodatno težavo povzročajo pri zdravljenju s CAR-T pogosti hudi stranski učinki, ki lahko vodijo celo v bolnikovo smrt, kar velja tako tako pri hematoloških oblikah raka kot pri solidnih tumorjih.

2 Adoptivne T-celične terapije

Med glavne terapevtske pristope v celični imunoterapiji raka sodijo pristopi s skupnim imenom adoptivna T-celična terapija (*angl.* adoptive T-cell therapy, ACT), včasih poimenovani tudi adoptivni celični prenos (*angl.* adoptive cell transfer, ACT). Gre za imunoterapijo na osnovi naravno prisotnih ali gensko spremenjenih celic, s katerimi lahko do-

sežemo regresijo tumorjev celo pri metastatskem raku (12). Pri teh pristopih se specifični limfociti T izolirajo, nato namnožijo in vbrizgajo bolniku (13), da bi prepoznali, ciljali na tumorske celice in jih uničili. ACT ima številne prednosti zaradi katerih je uporabna pri zdravljenju raka: 1. T-limfocitni odziv je specifičen in lahko celo loči zdravo od tumorske celice, 2. limfociti T se lahko po specifični aktivaciji klonsko množijo, 3. limfociti T lahko potujejo v smeri mesta antigena, 4. spominski limfociti T lahko vzdržujejo terapevtski učinek dolgo po začetku zdravljenja (14). Ključni dogodek oz. prelomnica pri razvoju tehnologij ACT je laboratorijska identifikacija specifičnih antigenov, povezanih s tumorskimi celicami (*angl.* tumor associated antigens, TAA), na podlagi katerih lahko imunske celice bolnika zanesljivo ločijo rakave celice od zdravih (15) tako, da na zdravem tkivu ne povzročajo škode in sicer: 1. ločijo antigene, ki so čezmerno izraženi na tumorskih celicah v primerjavi z zdravimi, 2. ločijo neoantigene, ki se izražajo na tumorskih celicah kot posledica somatskih mutacij in 3. ločijo antigene na tumorskih matičnih celicah (14). Identifikacija TAA, skupaj z novimi dognanji v klinični imunologiji rakavih bolnikov, je omogočila razvoj številnih oblik ACT, pri kateri se avtologni ali alogeni (1) limfociti T v različnih postopkih odzamejo iz bolnikovega krvnega obtoka ali tumorja ter stimulirajo, da se namnožijo v pogojih *in vitro*. Tako namnoženi se ponovno vbrizgajo v gostitelja/bolnika po limfodepleciji, pri kateri naj bi posredovali pri uničevanju tumorskih celic. Tak postopek je uporaben pri večini bolnikov, ki pred posegom nimajo učinkovitega imunskega odziva proti tumorju (1,14). ACT se lahko uporabijo tudi v kombinaciji s kemoterapijo in/ali z drugimi oblikami imunoterapije, da bi izboljšali razmnoževanje,

preživelost in funkcionalnost vnesenih terapevtskih celic ter zagotovili njihovo evolucijo v imunološko permisivnem okolju (1). Med adoptivne T-celične terapije sodijo poleg v uvodu omenjenih terapij s CAR-T še terapije s tumor-infiltrirajočimi limfociti (TIL), kar je povzeto v (16), ter terapije s transgenskimi T-limfocitnimi receptorji (TCR), kar je tudi povzeto v (16). Vse našete terapije so v kliničnih študijah sprožile regresijo tumorjev, a na žalost trenutno dosežejo trajne rezultate le pri delu bolnikov. Ovire na različnih ravneh pa za zdaj še omejujejo uspešnost adoptivnih T-celičnih terapij pri solidnih tumorjih.

Napredek v bazični molekularni biologiji nam je omogočil razvoj številnih pristopov genskega inženirstva limfocitov T na genomski ravni, na ravni RNA ter na epigenetski in proteinski ravni s ciljem farmakološko izboljšati imunski sistem (13,17).

Stanje znanja in tehnologije s kombinacijo različnih pristopov k celičnem inženirstvu in sodobnim vpogledom v biologijo limfocitov T in tumorsko imunost sta prišla do točke, ko je racionalno inženirstvo učinkovite T-limfocitne protitumorjske imunosti postalo praktično izvedljivo in ga je mogoče klinično preizkusiti (13). V nadaljevanju predstavljamo vse te tri načine zdravljenja z limfociti T.

3 Tumor infiltrirajoči limfociti (TIL)

Tumor infiltrirajoči limfociti (TIL) so bolnikovi limfociti, ki so zapustili krvni obtok in migrirali proti tumorju. Njihovo število je odvisno od tipa in stadija tumorja in je včasih povezano z napovedjo izida bolezni. TIL lahko najdemo v tumorju ali stromi, njihove naloge se lahko spreminjajo med napredovanjem rasti tumorja ali kot odgovor na protitumorjsko zdravljenje. Prisotnost limfocitov v

tumorju je pogosto povezana z boljšo napovedjo izida po zdravljenju (18-22).

Največ kliničnih uspehov je tehnologija TIL doslej prinesla pri kliničnem preizkušanju na področju zdravljenja solidnih tumorjev (23), še posebej metastatskih melanomov. Rezultate prve klinične študije s TIL na metastatskem melanomu so objavili že leta 1994 (24). TIL so pridobili iz pribl. 3-centimetrskih kosov tkiva metastatskega melanoma. Po resekciji tkivnega vzorca so TIL gojili v tkivnih kulturah ob prisotnosti interleukina-2 (IL2). Ko so pridobili dovolj TIL, so jih testirali na prepoznavanje avtolognih melanomskih celic; če le-te niso bile na voljo, pa na serijo HLA-ustreznih melanomskih celičnih linij. Odzivnost limfocitov so preverili z ugotavljanjem prisotnosti interferona- γ (IFN γ), izločenega v gojišče s testom ELISA. Izbrali so le kulture s TIL, reaktivnimi na melanome. Celice so namnožili s stimuliranjem s topnim protitelesom proti CD3 ob prisotnosti visokih koncentracij IL2 (6000 IU/ml) ter obsevanih alogenskih ali avtolognih hranilnih celic (24).

V preteklih letih smo uspeli pridobiti boljši vpogled v mehanizme delovanja TIL, še posebej glede vloge limfodeplecije lastnih limfocitov T pri gostitelju (bolniku, prejemniku terapije), vloge IL2 kot dejavnika preživetja vbrizganih TIL kot tudi optimalne kakovosti in količine vbrizganih celic ter vzorca, kako prepozna antigen (25,26). Oblike raka, iz katerih je bilo mogoče namnožiti reaktivne TIL, vključujejo tumorje dojke, prebavne cevi, glave in vratu, ledvic, pljuč, jajčnikov ter kutane in uvealne melanome, kar je povzeto v (23,25,26). Zdravljenje z reaktivnimi TIL po limfodeplecijski kemoterapiji je povzročilo objektivno zmanjšanje tumorjev pri vseh naštetih oblikah raka, tudi pri bolnikih s tumorji, ki so bili odporni na zdravljenje z inhibitorji imunskih kontrolnih točk (23). Čeprav

približno 50 % bolnikov z melanomom odgovari na terapijo s TIL (23,27), pa je regresija epitelnih tumorjev prisotna v povprečju pri manj kot 15 % bolnikov (23).

4 Transgeni T-celični receptorji

Naravni T-limfocitni receptor (*angl.* T-cell receptor, TCR) je zapletena, somatsko premeščena (23) molekula kot receptor na površini limfocitov T, ki je odgovorna za prepoznavanje antigenov, ki so kot peptidi vezani na kompleks MHC (*angl.* major histocompatibility complex, MHC). TCR je kot heterodimer sestavljen iz dveh različnih, visoko variabilnih proteinskih verig, najpogosteje α in β , izraženih kot del kompleksa s konstantnim proteinom CD3 (28). TCR nima samostojne sposobnosti prenašanja signala (23). Ob vezavi TCR na kompleks antigen/MHC se limfocit T aktivira v zapleteni kaskadi signalne transdukcije, kjer so udeleženi še koreceptorji, encimi in druge molekule, s katerimi se TCR nekovalentno povezuje (23). Vezava TCR na antigen ima sorazmerno nizko afiniteto in je degenerirana. To pomeni, da številni TCR lahko prepoznajo isti antigenski peptid ali pa številne antigenske peptide prepozna isti TCR (29).

Zgodnje klinične študije z gensko spremenjenimi limfociti T so se opirale na izražanje rekombinantnih, kloniranih TCR s ciljno afiniteto za tumorske antigene (30). Prvič so regresijo melanomov po zdravljenju z avtolognimi limfociti T, spremenjenimi s transgenskim TCR proti antigenu MART-1, opisali leta 2006 (31). TCR lahko prepozna tako znotraj- kot zunajcelične antigene, predstavljene na MHC (30). Zato ima dostop do bistveno večjega nabora antigenov kot CAR-T, kar sodi med najpomembnejše

prednosti tehnologije TCR pred CAR-T. Uvajanje transgenov TCR z γ -retro- ali lentivirusnimi vektorji povzroči kopičenje na naključno mesto v genomu limfocita T. Pri tem endogeni $\alpha\beta$ TCR ostane brezhiben, kar vodi v izražanje različnih kombinacij endo- in eksogenih heterodimerov TCR v gensko spremenjeni celici. Mešani heterodimeri endo- in eksogenih TCR lahko zmanjšajo delovanje pravilno dimeriziranih ter povzročijo toksične stranske učinke, ki lahko vodijo v bolezen presadka proti gostitelju. Podrobno poznavanje molekulske arhitekture naravnega TCR nam omogoča racionalne modifikacije njegove strukture, kar izboljša varnost, učinkovitost in nadgradljivost imunoterapij na osnovi TCR. Da bi izboljšali varnost in/ali povečali funkcionalnost, se lahko struktura transgenih TCR spreminja na več načinov. Te spremembe so: 1. zamenjava vseh ali izbranih delov humanih sekvenc z mišjimi – murinizacija (32,33), kar pa lahko vodi v imunizacijo, 2. cisteinske modifikacije, ki omogočajo drugo disulfidno vez (34), 3. modifikacije hidrofobnosti transmembranske regije TCR α (34), 4. inverzija humanih sekvenc TCR α (35), 5. mutageneza variabilnih regij TCR (*angl.* complementarity determining region, CDR) za povečanje afinitete, 6. okrepitev normalnih heterodimerov TCR (23) ter 7. s spreminjanjem/prilagajanjem limfocitov T s tehnologijo CRISPR/Cas9 (36). S ciljno integracijo transgenega TCR na 'varna mesta' v genomu, vključno z lokusom za endogeni TCR, lahko presežemo številne varnostne in funkcijske zadržke, kot npr.: 1. integracija transgena na definirana varna mesta izključi možnost motenj v delovanju normalnih genov oz. genotoksičnosti, 2. izključitev delovanja endogenega TCR onemogoči nepravilno dimerizacijo TCR z že naštetimi posledicami, 3. integracija na mesto endogenega lokusa TCR postavi transgen pod

fiziološki transkripcijski nadzor, kar zmanjša možnosti tonične signalizacije in imunološkega izčrpanja in 4. ciljna integracija transgena z nevirusnimi metodami zmanjša proizvodne stroške, ker je izdelava nukleinskih kislin GMP cenejša kot virusnih partiklov GMP (23,36). Raziskovalci poročajo o uspehu pri zdravljenju bolnikov z WT-1, pozitivnima AML in MDS, z WT-1 specifičnimi TCR-T (37).

5 Limfociti T, gensko spremenjeni s himernimi antigenskimi receptorji – CAR-T

Limfocite T lahko reprogramiramo oz. genetsko spremenimo tudi tako, da izražajo himerne antigenske receptorje (CAR), ki limfocite T povežejo s specifičnim antigenom na površini rakave ali druge bolne celice. CAR so sestavljeni iz antigen-prepoznavne domene, npr. enoverižnega variabilnega fragmenta monoklonskih protiteles (scFv), gibljivega tečaja, transmembranske domene ter znotrajceličnih signalnih in kostimulacijskih domen, ki so potrebne za aktiviranje limfocitov T (38,39). Ob vezavi scFv na specifični antigen se sproži znotrajcelična signalna kaskada, ki aktivira limfocit T proti ciljni tumorski celici preko T-celičnega receptorskega kompleksa CD3 ζ ter enega ali več kostimulacijskih receptorjev v znotrajceličnem delu CAR (39,40). Uvajanje kostimulacijskega receptorja v znotrajceličnem delu CAR druge generacije (prva generacija pomeni CAR brez kostimulacijskega receptorja) omogoča veliko število variacij glede antigenske specifičnosti, kostimulacijskih signalnih domen in komponent za aktiviranje limfocitov T. Poročajo o prek 100 specifičnostih za CAR s tehnologijo scFv in vsaj o osmih različnih

kostimulacijskih komponentah (41). Doslej so najbolj preučevali CAR-T druge generacije, ki vsebuje bodisi CD28 ali 4-1BB (41). Trenutno registrirani (2017 in 2018) terapevtiki CAR-T so izdelani na osnovi le-teh.

Doslej so bili limfociti T genetsko spremenjeni s CAR, ki lahko neodvisno od HLA prepoznajo različne antigene, povezane s tumorji (TAA), vključno z označevalcem limfocitov B – CD19 (38), nespremenjenimi proteini, glikoproteini (42), glikolipidi (43) in ogljikovimi hidrati (44).

Terapija s CAR-T dosega izredne uspehe v klinični praksi zlasti pri hematoloških oblikah raka (10) in pri bolnikih s ponovljeno boleznijo, odporno na kemoterapijo (45). Prvi terapevtiki na osnovi CAR-T, usmerjeni proti CD19+ limfocitom B, so bili registrirani pri FDA (2017) in EMA (2018) in so na voljo tudi že v Evropi, trenutno za zdravljenje akutnih limfoblastnih levkemij pri mlajših bolnikih ter za zdravljenje nekaterih oblik nehodgkinovega limfoma. Položaj je precej slabši pri kliničnih študijah, v katerih se preizkuša CAR-T za zdravljenje bolnikov s solidnimi tumorji (11), med drugim zaradi mikrookolja, ki ni naklonjeno celicam CAR-T. Najpogostejši hudi stranski učinki, ki lahko vodijo v smrt bolnikov, so: citokinska nevihta (*angl.* cytokine release syndrome, CRS), nevrotoksičnost (46), sindrom tumorske lize (47). Terapija s CD19 CAR T se mora zato izvajati po posebnem režimu priprave bolnika (prekondicioniranje) z deplecijo endogenih limfocitov, brez katere ne moremo pričakovati ustreznih učinkov terapije. Toksičnost terapije s celicami CAR-T se običajno uspešno nadzoruje z uporabo protiteles proti IL-6 (eden glavnih dejavnikov citokinske nevihte) ter kortikosteroidi ter delno ublaži z intenzivnostjo prekondicioniranja in z odmerjanjem limfocitov T (41). Rezultati

kliničnih raziskav z novejšimi konstrukti, ki vsebujejo nizkoafinitetno antigeno vezavno domeno proti CD19, kažejo na izboljšano proliferacijo in obstoj takih celic CAR-T pri pediatričnih bolnikih ter nižjo toksičnost (48). Podatki novejših kliničnih raziskav kažejo na to, da je tudi nevrotoksičnost terapije s CAR-T mogoče omiliti z uporabo popolnoma humanih konstruktov CAR (49).

Podobno kot pri antigenu CD19 so klinične študije s CAR-T uspešne tudi pri nekaterih drugih hematoloških ciljnih, npr. CD22 pri akutni limfoblastni levkemiji (ALL) in antigenu za zorenje limfocitov B (*angl.* B-cell maturation antigen, BCMA) pri diseminiranemu plazmocitomu (41,50,51). Ti antigeni so, poleg malignih, izraženi tudi na normalnih celicah, ki pa niso vitalnega pomena oz. so vsaj začasno pogrešljive (41). To pa ne velja za druge, pogosto omenjene cilje za CAR-T, npr. mezotelin, transmembranski receptor tirozin-protein kinazo (ROR1) ali serumski membranski antigen prostate (PSMA), ki so izraženi v delu normalne celične populacije. Že nizko izražanje teh antigenov v normalnih tkivih lahko povzroči statistično značilno toksičnost (41). Dodatno težavo pri solidnih tumorjih povzroča njihovo imunosupresivno mikrookolje, ki je ovira za vse vrste imunoterapije (3). Medcelično okolje je manj ugodno za delovanje limfocitov T zaradi hipoksije, nekroz, acidoze, pomanjkanja hranil ter palete imunosupresivnih molekul (PD-L1, IL-10, TGF β , indolamine-2-3-dioxygenase). Režim predpriprave bolnika pred zdravljenjem z limfociti T zmanjša vpliv teh dejavnikov (52). To pa običajno ni dovolj, da se odstranijo vsi dejavniki, ki inhibirajo.

Na Oddelku za razvojno-raziskovalno dejavnost Zavoda RS za transfuzijsko medicino v sodelovanju z Odsekom za sintezno biologijo in imunologijo

Kemijskega inštituta ter Kliničnim oddelkom za hematologijo UKC že vrsto let razvijamo svoje pristope za zdravljenje s CAR-T druge in tretje generacije. Ti pristopi vključujejo razvoj molekularskih konstruktorjev, ki jih s pomočjo transpozonskih ali virusnih vektorjev ter v obliki RNA izražamo v limfocitih T. Tako oborožene limfocite T nato v okolju dobre laboratorijske prakse razmnožimo ter preverimo njihovo funkcionalnost *in vitro* ter *in vivo*.

6 Razpravljanje in zaključki

Imunoterapija raka je nastajajoči četrti steber zdravljenja raka. Izkazalo se je, da pri različnih oblikah solidnih tumorjev (53) večini bolnikov trenutne imunoterapije ne koristijo. To še posebej velja za bolnike z zmerno mutiranimi tumorji, ki izhajajo iz epitelij (54), ki so skupaj vodilni razlog smrti zaradi raka (55). Da bi pri imunoterapiji do regresije tumorjev res prišlo, je potrebno hkrati izpolnjevati tri kritične zahteve, kar je povzeto v (23) 1. bolniki morajo imeti paleto limfocitov T, sposobnih prepoznati antigene na površini tumorskih celic. 2. isti antigensko specifični limfociti T morajo imeti sposobnost razmnoževanja in infiltriranja v tumorsko maso ter tam ostati. 3. limfociti T morajo ostati funkcionalni v tumorskem mikrokolju. Bolniki z običajnimi epitelijimi tumorji se soočajo s številnimi pomembnimi ovirami, ki omejujejo sposobnost T-limfocitnih linij, da bi izpolnjevale te zahteve. Vsaka od naštetih kritičnih zahtev se v osnovi lahko izpolni z uporabo adoptivnega celičnega prenosa (23).

Celična imunoterapija z adoptivnim celičnim prenosom v zadnjih letih pridobiva na pomenu. Zasluga za to gre kliničnim uspehom prvih genskih imunoterapevtikov na osnovi CAR-T za zdravljenje

ALL in nekaterih vrst ne Hodgkinovih limfomov. Z registracijo pri FDA (2017) in pri EMA (2018) so tovrstni terapevtiki končno dostopnejši nekoliko širšemu krogu bolnikov. S terapijo s CAR-T lahko dosežemo trajno remisijo pri bolnikih z refrakcijskimi B-limfoidnimi novotvorbami, medtem ko so rezultati zdravljenja solidnih tumorjev s CAR-T skromnejši (23). Dodatne strategije preusmerjanja T-limfocitne specifičnosti in citolitičnega delovanja lahko izboljšajo adoptivne celične terapije in njihovo vlogo pri zdravljenju raka. Čeprav so si rekombinantni antigenski receptorji TCR in CAR v določenem smislu podobni, pa se ta dva razreda antigenskih receptorjev razlikujeta glede na strukturo, afiniteto, organizacijo imunske sinapse in gostoto ciljnih antigenov, potrebnih, da se sprožijo T-limfocitne funkcije (23). TCR so izraženi na vseh limfocitih T in so komplementarni CAR, včasih pa imajo tudi prednosti pred njimi. V nasprotju s CAR, ki prepoznajo antigene na površju celic neodvisno od MHC (HLA), ki predstavljajo manjši del potencialnih proteinskih antigenov (56,57), pa lahko TCR prepoznajo na MHC predstavljene antigene katerega koli celičnega dela, vključno z membrano, citoplazmo ali jedrom. To omogoča TCR zaznavanje bistveno širšega spektra tarč, kot so neoantigeni, antigeni tumorskih matičnih celic in virusnih proteinov (23,30). Poleg tega se odzivajo TCR, ki imajo sposobnost, da učinkovito zaznajo in amplificirajo antigenske signale na nekajkrat nižje gostote epitopov kot TCR, ki so potrebne za signaliziranje sinteznih CAR (23). Doslej so vse terapije na osnovi transgenih TCR in TIL še v fazi kliničnega preizkušanja.

Ključni dogodek pri razvoju tehnologij ACT, ki pomembno opredeljuje njihovo varnost in učinkovitost, je identifikacija specifičnih antigenov, povezanih s tumorskimi celicami (*angl.* tumor

associated antigens, TAA). Na podlagi teh lahko imunske celice bolnika zanesljivo in varno ločijo rakave celice od zdravih (15) tako, da na zdravem tkivu ne povzročajo škode (*angl.* on-tumor, off-target effect). Povedano drugače: morebitna prizadetost zdravih celic s terapijo ne pomeni prevelikega tveganja za bolnika. Najbolj znan primer je terapija z anti-CD19 CAR-T, ki skupaj z malignimi odstrani tudi zdrave limfocite B in limfoblaste in povzroča aplazijo limfocitov B. To pa lahko do neke mere uspešno blažimo z zdravljenjem z imunoglobulini.

Ker gre pri ATC za revolucionarno terapijo, ki spreminja načine zdravljenja odpornih oblik raka, pa je jasno tudi, da gre za novo obliko terapije, s katero se je (z registriranimi terapevtiki) globalno zdravilo sorazmerno malo bolnikov. Stanje večine bolnikov, vključenih v klinične raziskave, se je spremljalo sorazmerno kratek čas. Kljub temu pa se količina podatkov, ki pričajo o zgodnjih odzivih na terapijo, hitro veča. Trajanje teh odzivov bo mogoče napovedati šele, ko se bo stanje bolnikov, udeleženih v študijah, spremljalo daljše obdobje. Pomembno je tudi, da se število bolnikov, vključenih v klinične študije, poveča. Le z večjim številom udeležencev, ki jih bomo spremljali daljše obdobje, bomo prišli do novih dognanj o učinku tega tipa terapij, o načinu, kako zmanjšati toksičnost, in kako izboljšati obravnavo ob stranskih učinkih.

Stanje kliničnih študij z ATC danes kaže na to, da se bo število terapevtikov na njihovi osnovi oz. število postopkov za pridobivanja le-teh v prihodnjih letih še povečevalo. To hkrati pomeni

tudi večjo dostopnost ATC bolnikom z najtežjimi boleznimi. Vendar pa se sočasno razvijajo tudi nove oblike TCR in TCR-podobnih struktur, ki prepoznavajo antigen (23). Pri teh pristopih personalizirana proizvodnja, ATC in gensko inženirstvo ne bodo potrebni, kar bo omogočilo boljšo dostopnost in širšo uporabo terapije.

S prvimi terapevtiki na osnovi CAR-T prihaja adoptivna T-limfocitna imunoterapija tudi v Slovenijo. Čeprav je to dobra novica, pa so te in podobne personalizirane terapije povezane z izredno visokimi stroški proizvodnje in s tem s stroški zdravljenja ter z zamudo, ki nastane od afereze oz. odvzema tkiva do izdaje ustreznega personalizirane terapevtika in samega zdravljenja. Vprašanje je, v kakšni meri in koliko časa bodo take terapije dosegljive najširšemu krogu bolnikov.

Že več let pri razvijanju tovrstnih adoptivnih celičnih terapij v translacijski verigi sodelujemo ustanove, kot so Kemijski inštitut, Odsek za sintezno biologijo in imunologijo, Zavod za transfuzijsko medicino, Oddelek za razvojno-raziskovalno dejavnost ter Klinični oddelek za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Translacijski trojček združuje vrhunske sintezne biologe Kemijskega inštituta, translacijske in proizvodne zmogljivosti, aferezni center Zavoda za transfuzijsko medicino ter vrhunske hematologe na UKC v Ljubljani. Ob večjem priznavanju domačega znanja in s tem njegovi večji uporabi bi lahko veliko storili za boljšo dostopnost modernih terapij, kot so adoptivne T-celične terapije, bolnikom v Sloveniji in zunaj nje.

Literatura

1. Fournier C, Martin F, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L, Apetoh L. Trial Watch: adoptively transferred cells for anticancer immunotherapy. *Oncolmmunology*. 2017;6(11):e1363139.

2. Iribarren K, Bloy N, Buqué A, Cremer I, Eggermont A, Fridman WH, et al. Trial Watch: immunostimulation with Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Oncol Immunology*. 2015;5(3):e1088631.
3. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011;480(7378):480-9.
4. Vacchelli E, Bloy N, Aranda F, Buqué A, Cremer I, Demaria S, et al. Trial Watch: immunotherapy plus radiation therapy for oncological indications. *Oncol Immunology*. 2016;5(9):e1214790.
5. Rosenberg SA. Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer—what clinicians need to know. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(10):577-85.
6. Sliwkowski MX, Mellman I. Antibody therapeutics in cancer. *Science*. 2013;341(6151):1192-8.
7. Dillman RO, Cornforth AN, McClay EF, Depriest C. Patient-specific dendritic cell vaccines with autologous tumor antigens in 72 patients with metastatic melanoma. *Melanoma Manag*. 2019;6(2):MMT20.
8. Pol J, Bloy N, Buqué A, Eggermont A, Cremer I, Sautès-Fridman C, et al. Trial Watch: peptide-based anticancer vaccines. *Oncol Immunology*. 2015;4(4):e974411.
9. Schwartzentruber DJ, Lawson DH, Richards JM, Conry RM, Miller DM, Treisman J, et al. gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2011;364(22):2119-27.
10. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*. 2014;371(16):1507-17.
11. Newick K, Moon E, Albelda SM. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for solid tumors. *Mol Ther Oncolytics*. 2016;3:16006.
12. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(4):269-81.
13. Kalos M, June CH. Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology. *Immunity*. 2013;39(1):49-60.
14. Perica K, Varela JC, Oelke M, Schneck J. Adoptive T Cell Immunotherapy for Cancer. *Rambam Maimonides Med J*. 2015;6(1):e0004.
15. Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol*. 2003;21(1):807-39.
16. Magalhaes I, Carvalho-Queiroz C, Hartana CA, Kaiser A, Lukic A, Mints M, et al. Facing the future: challenges and opportunities in adoptive T cell therapy in cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2019;19(8):811-27.
17. June C. Promises and challenges of engineered T cell therapies. *Hum Gene Ther*. 2009;20(11):1361.
18. Coussens LM, Zitvogel L, Palucka AK. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science*. 2013;339(6117):286-91.
19. Engblom C, Pfrirschke C, Zilionis R, Da Silva Martins J, Bos SA, Courties G, et al. Osteoblasts remotely supply lung tumors with cancer-promoting SiglecF high neutrophils. *Science*. 2017;358(6367):eaal5081.
20. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med*. 2015;21(8):938-45.
21. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21(3):309-22.
22. Syn NL, Teng MW, Mok TS, Soo RA. De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *Lancet Oncol*. 2017;18(12):e731-41.
23. Chandran SS, Klebanoff CA. T cell receptor-based cancer immunotherapy: emerging efficacy and pathways of resistance. *Immunol Rev*. 2019;290(1):127-47.
24. Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst*. 1994;86(15):1159-66.
25. Geukes Foppen MH, Donia M, Svane IM, Haanen JB. Tumor-infiltrating lymphocytes for the treatment of metastatic cancer. *Mol Oncol*. 2015;9(10):1918-35.
26. Nguyen LT, Saibil SD, Sotov V, Le MX, Khoja L, Ghazarian D, et al. Phase II clinical trial of adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and low-dose interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68(5):773-85.
27. Rosenberg SA, Packard BS, Aebbersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med*. 1988;319(25):1676-80.
28. Janeway CA. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect*. 2001;3(13):1167-71.
29. Sewell AK. Why must T cells be cross-reactive? *Nat Rev Immunol*. 2012;12(9):669-77.
30. Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(9):566-81.
31. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*. 2006;314(5796):126-9.
32. Bialer G, Horovitz-Fried M, Ya'acobi S, Morgan RA, Cohen CJ. Selected murine residues endow human TCR with enhanced tumor recognition. *J Immunol*. 2010;184(11):6232-41.
33. Sommermeyer D, Uckert W. Minimal amino acid exchange in human TCR constant regions fosters improved function of TCR gene-modified T cells. *J Immunol*. 2010;184(11):6223-31.
34. Cohen CJ, Li YF, El-Gamil M, Robbins PF, Rosenberg SA, Morgan RA. Enhanced antitumor activity of T cells engineered to express T-cell receptors with a second disulfide bond. *Cancer Res*. 2007;67(8):3898-903.
35. Voss RH, Willemsen RA, Kuball J, Grabowski M, Engel R, Intan RS, et al. Molecular design of the Calpha-beta interface favors specific pairing of introduced TCRalpha-beta in human T cells. *J Immunol*. 2008;180(1):391-401.

36. Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*. 2020;367(6481):eaba7365.
37. Tawara I, Kageyama S, Miyahara Y, Fujiwara H, Nishida T, Akatsuka Y, et al. Safety and persistence of WT1-specific T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with AML and MDS. *Blood*. 2017;130(18):1985-94.
38. Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Stetler-Stevenson M, Feldman SA, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood*. 2010;116(20):4099-102.
39. Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov*. 2013;3(4):388-98.
40. Siegler EL, Kim YJ, Chen X, Siriwon N, Mac J, Rohrs JA, et al. Combination Cancer Therapy Using Chimeric Antigen Receptor-Engineered Natural Killer Cells as Drug Carriers. *Mol Ther*. 2017;25(12):2607-19.
41. Sadelain M. Chimeric Antigen Receptors: A Paradigm Shift in Immunotherapy. *Annu Rev Cancer Biol*. 2017;1(1):447-66.
42. Posey AD, Clausen H, June CH. Distinguishing Truncated and Normal MUC1 Glycoform Targeting from Tn-MUC1-Specific CAR T Cells: Specificity Is the Key to Safety. *Immunity*. 2016;45(5):947-8.
43. Rossig C, Bollard CM, Nuchtern JG, Rooney CM, Brenner MK. Epstein-Barr virus-specific human T lymphocytes expressing antitumor chimeric T-cell receptors: potential for improved immunotherapy. *Blood*. 2002;99(6):2009-16.
44. Mezzanzanica D, Canevari S, Mazzoni A, Figini M, Colnaghi MI, Waks T, et al. Transfer of chimeric receptor gene made of variable regions of tumor-specific antibody confers anticarbohydrate specificity on T cells. *Cancer Gene Ther*. 1998;5(6):401-7.
45. Sadelain M. CAR therapy: the CD19 paradigm. *J Clin Invest*. 2015;125(9):3392-400.
46. Karschnia P, Jordan JT, Forst DA, Arrillaga-Romany IC, Batchelor TT, Baehring JM, et al. Clinical presentation, management, and biomarkers of neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CAR T cells. *Blood*. 2019;133(20):2212-21.
47. Porter DL, Kalos M, Zheng Z, Levine B, June C. Chimeric Antigen Receptor Therapy for B-cell Malignancies. *J Cancer*. 2011;2:331-2.
48. Ghorashian S, Kramer AM, Onuoha S, Wright G, Bartram J, Richardson R, et al. Enhanced CAR T cell expansion and prolonged persistence in pediatric patients with ALL treated with a low-affinity CD19 CAR. *Nat Med*. 2019;25(9):1408-14.
49. Brudno JN, Lam N, Vanasse D, Shen YW, Rose JJ, Rossi J, et al. Safety and feasibility of anti-CD19 CAR T cells with fully human binding domains in patients with B-cell lymphoma. *Nat Med*. 2020;26(2):270-80.
50. D'Agostino M, Rajee N. Anti-BCMA CAR T-cell therapy in multiple myeloma: can we do better? *Leukemia*. 2020;34(1):21-34.
51. Shah N, Chari A, Scott E, Mezzi K, Usmani SZ. B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches. *Leukemia*. 2020;34(4):985-1005.
52. Wrzesinski C, Paulos CM, Kaiser A, Muranski P, Palmer DC, Gattinoni L, et al. Increased intensity lymphodepletion enhances tumor treatment efficacy of adoptively transferred tumor-specific T cells. *J Immunother*. 2010;33(1):1-7.
53. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*. 2018;359(6382):1350-5.
54. Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, Hellmann MD, Shen R, Janjigian YY, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet*. 2019;51(2):202-6.
55. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(1):7-34.
56. Fagerberg L, Jonasson K, von Heijne G, Uhlén M, Berglund L. Prediction of the human membrane proteome. *Proteomics*. 2010;10(6):1141-9.
57. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419.