

# Innowacyjna terapia CAR-T w leczeniu nowotworów hematologicznych — wybrane aspekty genetyczne i immunologiczne

## Innovative CAR T-cell therapy in the treatment of haematological malignancies: selected genetic and immunological aspects

Katarzyna Karwicka<sup>1</sup>, Joanna Wawer<sup>2</sup>, Olga Czabak<sup>1</sup>, Janusz Kocki<sup>2</sup>, Marek Hus<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

<sup>2</sup>Zakład Genetyki Klinicznej, Katedra Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

### Streszczenie

Terapia polegająca na genetycznej modyfikacji limfocytów T, która prowadzi do ekspresji chimerycznego receptora antygenowego (CAR), stała się niedawno jedną z najbardziej obiecujących metod terapii nowotworów hematologicznych. Przeprogramowane limfocyty T rozpoznają określone antygeny na powierzchni komórek docelowych, co w konsekwencji wyzwala ich aktywację niezależną od układu zgodności tkankowej. Odpowiednia selektywność antygenowa i sygnalizacja wewnątrzkomórkowa jest wykorzystywana do zabijania komórek nowotworowych. Zastosowanie limfocytów CAR-T anty-CD19 w przypadku chłoniaka rozlanego z dużych komórek B oraz ostrej białaczki limfoblastycznej radykalnie zmieniło sposób leczenia nowotworów limfoidalnych u pacjentów z nawrotem lub opornością na standardowe terapie. Transdukcja genetyczna obejmuje nie tylko białko fuzyjne CAR modyfikowane za pomocą retrowirusa lub lentiwirusa, ale także domeny kostymulujące, geny samobójcze, transgeny do produkcji dodatkowych cząsteczek efektorowych, bispecyficzne CAR oraz inhibitory punktów kontrolnych. Stosowane są również nowoczesne technologie inżynierii genetycznej do edycji genów, na przykład TALEN lub CRISPR/Cas9. Celem tych nowoczesnych technik jest zwiększenie odsetka odpowiedzi i wydłużenie czasu trwania remisji, ukierunkowanie terapii na nowe jednostki chorobowe, zmniejszenie toksyczności i stworzenie „uniwersalnych komórek CAR-T”. Potencjalne mechanizmy niepowodzenia terapii limfocytami CAR-T obejmują ucieczkę nowotworu spod nadzoru immunologicznego (np. poprzez utratę ekspresji CD19), mikrośrodowisko immunosupresyjne, wyczerpanie limfocytów CAR-T lub zmniejszenie ich aktywności. W pracy opisano również toksyczność CAR-T oraz potencjalne sposoby zapobiegania lub leczenia niebezpiecznych czy zagrażających życiu zdarzeń niepożądanych.

**Słowa kluczowe:** terapia CAR-T, CAR-T, immunoterapia nowotworu, chimeryczny receptor antygenowy, nowotwory hematologiczne, mikrośrodowisko nowotworu

*Hematologia 2020; 11, 3: 166–182*

### Abstract

Genetic modification of T lymphocytes which can produce the expression of chimeric antigen receptor (CAR) is a novel option for the treatment of haematological malignancies. The results seem to be promising. Reprogrammed T cells recognize specific antigens on the surface of target cells,

Adres do korespondencji: Katarzyna Karwicka, Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Staszica 11, 20–081 Lublin, e-mail: katarzyna.karwicka2@gmail.com

*which in turn triggers their activation independently of MHC. Appropriate antigen selectivity and intracellular signalling facilitates killing cancer cells. The use of anti-CD19 CAR-T lymphocytes in the treatment of DLBCL and ALL has radically changed the way lymphoid neoplasms are treated, especially in patients who experience relapses or resist standard therapies. The genetic transduction involves not only CAR fusion protein modified by a retrovirus or lentivirus, but also costimulatory domains, suicide genes, and transgenes to produce additional effector molecules and CAR bispecific checkpoint inhibitors. Modern genetic engineering technologies such as TALEN or CRISPR/Cas9 are used to edit genes. Their goal is to improve the response rate and extend remission duration time, target new diseases, reduce toxicity, and possibly create 'universal CAR-T cells'. Potential mechanisms of CAR-T lymphocyte failure include tumour escaping from immune surveillance (e.g., by loss of CD19 expression), immunosuppressive microenvironment, depletion of CAR-T lymphocytes, or their decreased activity. This review also discusses potential toxicity and possible ways to prevent or treat dangerous or life-threatening adverse effects of the therapy.*

**Key words:** CAR-T therapy, CAR-T, cancer immunotherapy, chimeric antigen receptor, haematological malignancies, tumour microenvironment

*Hematologia* 2020; 11, 3: 166–182

## Wprowadzenie

Przez długi czas podstawy leczenia nowotworów stanowiły chirurgia, chemioterapia i radioterapia. W ostatnich latach immunoterapia zrewolucjonizowała leczenie onkologiczne, również w odniesieniu do nowotworów układu krwiotwórczego [1]. Wprowadzenie przeciwciał monoklonalnych przyniosło zwiększenie odsetka odpowiedzi klinicznych i wydłużenie czasu przeżycia. Pojawiła się nowa metoda immunoterapii polegająca na wzmocnieniu siły i jakości odpowiedzi układu odpornościowego pacjenta, w skład której wchodzi między innymi inhibitory punktu kontrolnego, przeciwciała bispecyficzne i limfocyty T z ekspresją chimerycznego receptora antygenowego (CAR-T, *chimeric antigen receptor T cells*) [2, 3]. Terapia jest oparta na adoptywnym transferze komórek (ACT, *adoptive T-cell transfer*) i polega na izolacji, genetycznej modyfikacji i infuzji autologicznych komórek odpornościowych [3, 4]. Wyodrębnia się kilka rodzajów ACT, w tym limfocyty naciekające nowotwór (TIL, *tumor-infiltrating lymphocytes*) oraz receptor limfocyty T (TCR, *T-cell receptor*). W przeprowadzonych badaniach dowiedziono, że fundamentalny postęp kliniczny przypisuje się immunoterapii CAR-T. Początkowo stosowanie terapii CAR-T było ograniczone do niewielkich badań klinicznych, głównie obejmujących pacjentów z zaawansowanymi nowotworami hematologicznymi. Jednak spektakularne efekty leczenia tych chorych, w szczególności z oporną lub nawrotową postacią nowotworu, u których wykorzystano już wszystkie standardowe schematy leczenia, ustanowiły punkt

zwrotny w postępowaniu klinicznym. Zwróciły bowiem uwagę — zarówno badaczy, jak i opinii publicznej — oraz stały się tak zwanym piątym filarem leczenia nowotworów hematologicznych, zapoczątkowując tym samym nowy obszar leczenia przeciwnowotworowego [1, 3–5].

W 2017 roku terapię CAR-T zatwierdziła amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) w leczeniu dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL, *acute lymphoblastic leukemia*) oraz dorosłych z zaawansowaną postacią chłoniaka rozlanego z dużych komórek B (DLBCL, *diffuse large B-cell lymphoma*) [3, 6–9]. W wieloośrodkowych badaniach klinicznych wykazano możliwość uzyskania długotrwałej remisji u pacjentów z DLBCL oraz ALL leczonych limfocytami CAR-T anty-CD19 w przypadku braku skutecznych innych opcji terapeutycznych. Dwa produkty, tisagenlecleucel (tisa-cel) oraz axicabtageneclisoleucel (axi-cel), uzyskały rejestrację FDA [10]. W sierpniu 2017 roku, na podstawie badań klinicznych: NCT02228096 oraz NCT02435849 (ELIANA), FDA zarejestrowała pierwszą terapię genową komórkami typu CAR-T w leczeniu nowotworów, a dokładnie chorych na ALL. Tisagenlecleucel (dawniej CTL019) pozwolił na uzyskanie całkowitej remisji (CR, *complete response*) u 80–90%, z całkowitym przeżyciem (OS, *overall survival*) po roku wynoszącym 76% u dzieci i młodych dorosłych (do 25. rż.) z nawrotową lub oporną na leczenie ALL [11–13]. Natomiast axi-cel (dawniej KTE-C19) FDA zatwierdziła, na podstawie badania klinicznego NCT02348216 (ZUMA-1), w październiku 2017 roku do leczenia dorosłych pacjentów z oporną

postacią choroby lub nawrotem po co najmniej dwóch liniach terapii standardowej. Yescarta<sup>TM</sup> stała się drugą terapią genową zatwierdzoną przez FDA i pierwszą w leczeniu DLBCL, pierwotnego chłoniaka śródpiersia z dużych komórek B (PMBL, *primary mediastinal large B-cell lymphoma*), chłoniaka o wysokim stopniu złośliwości z komórek B i DLBCL powstałego w wyniku transformacji chłoniaka grudkowego (FL, *follicular lymphoma*). Całkowity odsetek odpowiedzi (ORR, *overall response rate*) i CR wynosiły odpowiednio 82% i 54% [10, 11, 14]. Kymriah<sup>TM</sup> (tisa-cel) również zatwierdzono, w maju 2018 roku na podstawie badań klinicznych NCT02030834 oraz NCT02445248 (JULIET), dla dorosłych pacjentów z oporną/nawrotową postacią DLBCL po dwóch liniach terapii standardowej. Odsetek ORR i CR po 6 miesiącach wynosił odpowiednio 54% oraz 40%. W przeciwieństwie do axi-cel, tisagenlecleucel nie jest zatwierdzony do leczenia PMBL. Wstępne wyniki badań klinicznych wydają się bardzo obiecujące w przypadku liso-cel (JCAR017) — trzeciego produktu oczekującego na rejestrację [9, 11, 13, 15, 16]. Tecartus<sup>TM</sup> (brexucabtageneautoleucel) to terapia limfocytami CAR-T przeznaczona dla pacjentów z chłoniakiem z komórek płaszczka (MCL, *mantle cell lymphoma*), którzy nie odpowiedzieli na standardowe schematy leczenia lub u których doszło do nawrotu choroby. Tecartus<sup>TM</sup> (KTE-X19) stał się pierwszą komórkową terapią genową zatwierdzoną w lipcu 2020 roku przez FDA do leczenia MCL. W badaniu klinicznym NCT02601313 (ZUMA-2) ORR po leczeniu wyniósł 93%, a odsetek CR — 67% [17, 18].

### Schemat terapii

Terapia CAR-T opiera się na wykorzystaniu limfocytów T, które pełnią kluczową rolę w koordynowaniu odpowiedzi immunologicznej, niszczeniu komórek zakażonych patogenami i komórek nowotworowych [4]. W pierwszym etapie komórki jednojądrzaste krwi obwodowej pobiera się metodą leukaferazy oraz poddaje sortowaniu w celu wyizolowania limfocytów T. Następnie, przy użyciu dezaktywowanego wektora wirusowego, aktywowane limfocyty T są modyfikowane genetycznie w celu wytworzenia receptorów na ich powierzchni [19–21]. Specjalne zsyntetyzowane chimeryczne receptory antygenowe (CAR, *chimeric antigen receptors*) pozwalają limfocytom T rozpoznawać i przyłączać się do określonego antygeny obecnego na powierzchni komórek nowotworowych [4]. Obecnie najlepiej zbadana oraz najszerzej stosowana jest terapia CAR-T wykorzystująca

limfocyty T skierowane przeciwko antygenowi CD19 [22–24]. W momencie gdy zgromadzone komórki zostaną zaprojektowane do ekspresji CAR specyficznego dla antygeny, następuje ich amplifikacja do klinicznie istotnych wartości. W kolejnym etapie są one zamrażane, testowane pod kątem jakości, transportowane i podawane drogą infuzji dożylną (*i.v., intravenous*) pacjentowi po uprzedniej chemioterapii [21, 25]. Po wykonaniu procedury zmodyfikowane genetycznie limfocyty T ulegają aktywacji oraz proliferacji w organizmie pacjenta w wyniku pobudzenia receptora zaprogramowanego na rozpoznawanie antygeny związanego z nowotworem (TAA, *tumour-associated antigen*). Ponadto jedną procedurę CAR można zastosować do leczenia wszystkich nowotworów wykazujących ekspresję tego samego antygeny.

W badaniach klinicznych opracowuje się i testuje coraz większą liczbę terapii komórkami CAR-T. Celem jest poprawa efektywności i dystrybucji zmodyfikowanych komórek oraz rozszerzenie profilu dostępnych molekuł skierowanych przeciwko różnorodnym antygenom (tab. 1) [11]. Nieustannie podejmuje się próby zwiększenia skuteczności przeciwnowotworowej oraz eliminacji działań niepożądanych [4]. Choć istnieją kluczowe różnice między tymi terapiami, to protokół ich wszystkich jest podobny [3].

### Budowa receptora

Limfocyty T wykazują swoistość wobec komórek nowotworowych przez rekombinowane białka fuzyjne CAR, czyli receptory syntetyczne zawierające domenę rozpoznającą antygen (część zewnątrzkomórkowa), którą tworzy najczęściej jednołańcuchowy fragment zmienny przeciwciała (scFv, *a single-chain variable fragment*) [3, 26], zawias lub element dystansowy, domena transbłonowa [27, 28] oraz domena sygnałowa (część wewnątrzkomórkowa) stymulująca proliferację komórek T, cytolizę i wydzielanie cytokin w celu wyeliminowania komórki docelowej [3]. Region zawiasowy, który często pochodzi od ludzkiej IgG1, IgG4 i CD8, jest przeznaczony do łączenia scFv z domeną transbłonową [29–31]. Wyróżnia się co najmniej cztery generacje CAR-T (ryc. 1) [3, 4, 32–34]. Pierwszą charakteryzuje pojedyncza cząsteczka sygnalizacyjna i najczęściej stosuje się CD3 $\zeta$ , natomiast CAR drugiej generacji, może generować podwójne sygnały poprzez CD3 $\zeta$  i endodomenę kostymulującą (np. CD28 lub 4-1BB) [20, 33, 35–37]. Z kolei CAR trzeciej generacji składają się z dwóch domen kostymulujących powiązanych

**Tabela 1.** Wybrane badania kliniczne dotyczące terapii limfocytami T z ekspresją chimerycznego receptora antygenowego (CAR-T) (na podstawie [11])**Table 1.** Selected clinical trials of chimeric antigen receptor T cells (CAR-T) therapy (according to [11])

Antygen	Choroba	Numer referencyjny badania klinicznego
CD19 i CD22	B-ALL	NCT03620058; NCT03241940; NCT03330691; NCT03289455
	B-ALL i DLBCL	NCT03233854
	B-ALL, CLL, NHL, mięsak limfatyczny	NCT03448393
	DLBCL	NCT03287817
	Chłoniaki B-komórkowe	NCT02903810
CD19 i CD20	NHL i CLL	NCT03019055; NCT03870945
CD10, CD20 i CD22	B-ALL	NCT03407859
CD22, CD123, CD38, CD10, CD20, TSLPR	B-ALL	NCT04016129
CD19, CD20, CD22, CD30, CD38, CD70, CD123	Chłoniaki B-komórkowe	NCT03125577
BCMA i CD19	Szpiczak plazmocytowy	NCT03549442; NCT03455972; NCT03706547; NCT03767725
BCMA i CD38	Szpiczak plazmocytowy	NCT03767751
BCMA i TACI	Szpiczak plazmocytowy	NCT03287804
BCMA, CD19, CD38	Szpiczak plazmocytowy	NCT03196414
BCMA, CD38, CD56, CD138	Szpiczak plazmocytowy	NCT03271632; NCT03473496
Integryna $\beta 7$ , BCMA, CS1, CD38, CD138	Szpiczak plazmocytowy	NCT03778346
CD33, CD123 lub CLL-1	AML	NCT04010877
MUC1, CLL1, CD33, CD38, CD56, CD123	AML	NCT03222674
CD33, CD38, CD56, CD123, CD117, CD133, CD34, MUC1	AML	NCT03473457

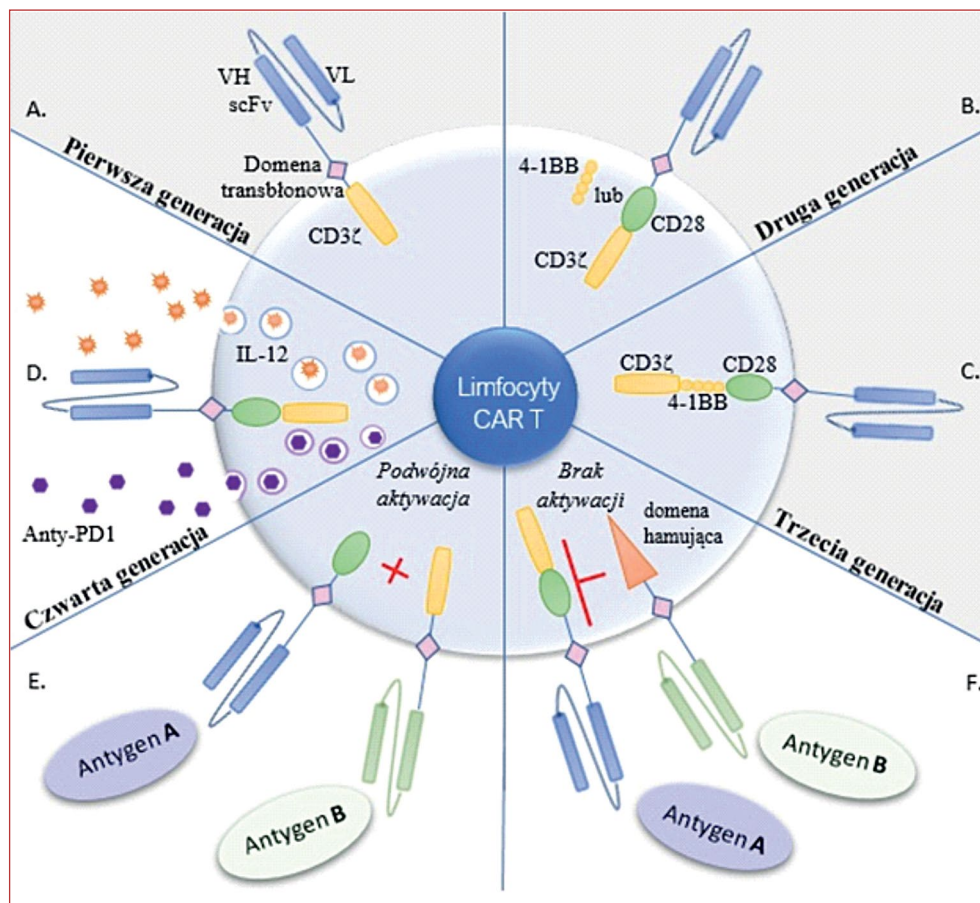
B-ALL (*B-cell acute lymphoblastic leukemia*) — ostra białaczka limfoblastyczna z komórek B; DLBCL (*diffuse large B-cell lymphoma*) — chłoniak rozlany z dużych komórek B; CLL (*chronic lymphocytic leukemia*) — przewlekła białaczka limfocytowa; NHL (*non-Hodgkin lymphoma*) — chłoniak nie-Hodgkina; AML (*acute myeloid leukemia*) — ostra białaczka szpikowa

z CD3 $\zeta$  (np. CD28, 4-1BB lub OX40) [3, 33]. Czwarta generacja to zróżnicowana grupa, obejmująca na przykład komórki T typu TRUCK (ang. *T cells re-directed for universal cytokine killing*) [25, 36] czy CAR-T z genami samobójczymi [38, 39].

Limfocyty CAR-T pierwszej generacji wykazywały aktywność *in vitro*, przy braku skuteczności *in vivo*, prawdopodobnie z powodu indukowanej aktywacją śmierci komórek (AICD, *activation-induced cell death*) przeszczepionych limfocytów T lub przez brak długotrwałej ekspansji limfocytów T [4, 40–43]. W przypadku drugiej generacji receptorów stwierdzono skuteczność kliniczną i stałość działania. Obecność domeny kostymulującej wzmacnia ciągłą proliferację komórek [43–45], co powoduje ekspansję logarytmiczną i umożliwia komórkom promowanie apoptozy poprzez cytolizę i produkcję toksycznych cytokin [1]. Komórki

CAR-T drugiej generacji najlepiej przebadano i są najczęściej wykorzystywane w innowacyjnych projektach (tab. 2) [10, 11, 13, 14, 16, 46, 47]. Chimeryczne receptory antygenowe zawierające 4-1BB (CD137) charakteryzowały się niższym stężeniem uwalnianych cytokin, jednak wykazywały większą trwałość działania *in vivo* niż CD28 [4, 22, 36, 37, 48]. W celu wzmocnienia potencjału przeciwnowotworowego do receptora trzeciej generacji dodano kolejne cząsteczki kostymulujące. Wyniki badań są niejednoznaczne pod względem bezpieczeństwa i skuteczności terapii z powodu nadmiernego wydzielania cytokin [43, 49, 50]. W związku z tym limfocyty CAR-T trzeciej generacji nadal podlegają modyfikacjom. Celem wprowadzenia genu samobójczego, między innymi transdukowanego receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFRt, *transduced epidermal growth*





**Rycina 1.** Wybrane generacje i modyfikacje chimerycznego receptora antygenowego (CAR) (na podstawie [3, 4, 33, 34]): **A.** CAR pierwszej generacji składa się z jednołańcuchowego fragmentu zmiennego (scFv) rozpoznającego antygen, domeny transbłonowej i wewnątrzkomórkowej domeny sygnalizacyjnej CD3 $\zeta$ ; **B.** CAR drugiej generacji różni się od pierwszej generacji poprzez dodanie domeny kostymulującej (CD28 lub 4-1BB); **C.** Natomiast CAR trzeciej generacji zawierają dwie domeny kostymulujące, zarówno CD28, jak i 4-1BB; **D.** Czwarta generacja obejmuje komórki TRUCK uwalniające transgeniczne białko (np. interleukina 12 [IL-12], przeciwciała przeciw białku programowanej śmierci komórki 1 [anty-PD-1] itd.). Nowoczesne konstrukcje CAR uwzględniają: **E.** Chimeryczne receptory kostymulujące (CCR), aktywowane wyłącznie dwoma lub trzema antygenami ekspresowanymi jednocześnie na komórkach nowotworowych (np. bispecyficzne komórki CAR-T CD19-CD20) oraz **F.** iCAR, zawierające na przykład inhibitory punktu kontrolnego (np. PD-1, białko 4 związane z cytotoksycznymi limfocytami T [CTLA-4]), które po kontakcie z prawidłową komórką blokują aktywację CAR; VH — zmienny łańcuch ciężki

**Figure 1.** Selected generations and modifications of the chimeric antigen receptor (CAR) (acc. to [3, 4, 33, 34]): **A.** The first generation chimeric antigen receptor (CAR) construct consist of a single-chain variable fragment (scFV) antigen-recognition domain, transmembrane domain, and an intracellular activation domain derived from the CD3 $\zeta$ ; **B.** The second generation CAR differs from the first generation by the addition of a costimulatory domain (either CD28 or 4-1BB); **C.** The third generation CAR constructs incorporate two costimulatory domains, such as both CD28 and 4-1BB; **D.** The fourth generation includes TRUCK cells that release a transgenic protein (e.g., interleukin 12 [IL-12], anti-programmed cell death protein 1 [anti-PD-1] antibodies, etc.). Modern CAR constructs include: **E.** Chimeric co-stimulatory receptors (CCR), activated by two or three antigens expressed simultaneously on tumor cells (e.g., bispecific CD19-CD20 CAR-T cells) and **F.** iCAR, includes immune checkpoints (e.g., expression of PD-L1, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 [CTLA-4]) which block the activation of CAR T-cell after contact with a healthy cell; VH — variable heavy chain

*factor receptor*), wirusa opryszczki zwykłej kinazy tymidynowej (HSV-TK, *herpes simplex virus-1 thymidine kinase*) lub indukowanej kaspazy 9

(iCasp9, *inducible caspase 9*), do zmodyfikowanych limfocytów T jest złagodzenie nieoczekiwanej lub ciężkiej toksyczności zagrażającej życiu pacjenta

**Tabela 2.** Charakterystyka wybranych produktów leczniczych obejmujących chimeryczne receptory antygenowe (CAR) drugiej generacji w chłoniakach B-komórkowych (na podstawie [10, 11, 13, 14, 16, 46, 47])**Table 2.** Characteristics of selected medicinal products including second-generation chimeric antigen receptor (CAR) in B-cell lymphomas (acc. to [10, 11, 13, 14, 16, 46, 47])

Parametr	Axicabtageneclorcel (KTE C19)	Tisagenlecleucel (CTL019)	Lisocabtagenemarleucel (JCAR017)
Badanie kliniczne	ZUMA-1	JULIET	TRANSCEND-001
Pacjenci zakwalifikowani (poddani leczeniu)	111 (101)	165 (111)	134 (114) — FULL 73 — CORE
Mediana czasu obserwacji	27,1 mies.	19,3 mies.	12 mies.
Dawka CAR-T	$2,0 \times 10^6$ komórek/ /kg mc.	Mediana $3,1 \times 10^8$ komórek kg mc.	I — $5,0 \times 10^7$ komórek II — $1,0 \times 10^8$ komórek
<b>Skuteczność</b>			
Najlepsza ORR (CR)	82% (54%)	52% (40%)	80% (59%)
Po 6 mies. ORR (CR)	41% (36%)	33% (29%)	47% (41%)
Bieżąca ORR (CR)	39% (37%)	Brak	Brak
mDOR	11,1 mies.	Brak	9,2 mies.
<b>Charakterystyka produktu</b>			
Domena kostymulująca	CD28	4-1BB (CD 137)	4-1BB (CD 137)
Wektor	Retrowirus	Lentiwirus	Lentiwirus
Zdefiniowany rodzaj komórek	Nie	Nie	Tak, stały stosunek CD4:CD8
Chemioterapia limfodeplecyjna (przez 3 dni)	Cy 500 mg/m <sup>2</sup> Flu 30 mg/m <sup>2</sup>	Cy 250 mg/m <sup>2</sup> Flu 25 mg/m <sup>2</sup> (lub B 90 mg/m <sup>2</sup> przez 2 dni)	Cy 300 mg/m <sup>2</sup> Flu 30 mg/m <sup>2</sup>
Wskazanie do stosowania (zatwierdzone wg FDA)	DLBCL, PMBCL ≥ 18 rż.	DLBCL ≥ 18 rż. ALL ≤ 25 rż.*	Niezatwierdzony do użytku komercyjnego — oczekiwanie na rejestrację
<b>Toksyczność towarzysząca terapii oraz zaaplikowane leczenie</b>			
CRS (stopień ≥ 3.)	92% (11%)	58% (22%)	42% (2%)
NT (stopień ≥ 3.)	67% (32%)	21% (12%)	30% (10%)
Tocilizumab	43%	14%	19%
Kortykosteroidy	27%	10%	21%

\*Na podstawie przeprowadzonego badania klinicznego ELIANA; ORR (*overall response rate*) — wskaźnik odpowiedzi ogółem; CR (*complete response*) — odpowiedź całkowita; mDOR (*median duration of response*) — średni czas trwania odpowiedzi; Cy — cyklofosfamid; Flu — fludarabina; B — bendamustyna; FDA (*Food and Drug Administration*) — Agencja ds. Żywności i Leków; DLBCL (*diffuse large B-cell lymphoma*) — chłoniak rozlany z dużych komórek B; PMBCL (*primary mediastinal large B-cell lymphoma*) — pierwotny chłoniak śródpiersia z dużych komórek B; ALL (*acute lymphoblastic leukemia*) — ostra białaczka limfoblastyczna; CRS (*cytokine release syndrome*) — zespół uwalniania cytokin; NT — neurotoksyczność

[3, 43, 51–53]. Jednocześnie obserwuje się znieśnienie skuteczności przeciwnowotworowej [53]. Selektowna apoptoza komórek transgeniczných *in vivo* jest możliwa poprzez podanie pacjentowi przeciwciał bądź ligandów indukujących tę reakcję [53, 54]. Komórki czwartej generacji reprezentują również komórki typu TRUCK — zmodyfikowane limfocyty CAR-T drugiej generacji, które konstytutywnie wytwarzają białko transgeniczne. Najczęściej jest indukowana interleukina 12 (IL-12), ale w praktyce nie ma ograniczeń w wytwarzaniu i uwalnianiu transgeniczných polipeptydów, w tym chemokin, inhibitorów, przeciwciał lub enzymów [25, 43]. Komórki TRUCK sytuują różne białka

terapeutyczne w docelowej tkance. Technicznie inżynieria genetyczna limfocytów TRUCK wymaga przeniesienia dwóch transgenów, dla CAR i dla indukowanej cytokiny, które wymagają integracji w różnych miejscach genomowych. Dokonuje się tego poprzez dwie kolejne modyfikacje genetyczne i izolację zmodyfikowanych limfocytów T [25]. Ten typ komórek poprawił eradykację nowotworu, uwalniając cytokiny i angażując do działania wrodzone komórki odpornościowe w otaczającym nowotwór mikrośrodowisku [43, 55]. Łączenie ataku limfocytów CAR-T z wrodzoną odpowiedzią immunologiczną może stanowić strategię zapobiegania nawrotom nowotworów, prowadząc do lokalnego

osiągnięcia stężeń terapeutycznych bez potrzeby ponownego podawania leku [43, 56] i uniknięcia toksyczności ogólnoustrojowej [25].

Budowa komórki CAR umożliwia niezależne od głównego układu zgodności tkankowej (MHC, *major histocompatibility complex*) rozpoznawanie antygeny przez limfocyty T i ich jednoczesną aktywację. Niezależne od restrikcji MHC rozpoznawanie antygenów nowotworowych przez CAR stanowi podstawę działania przeciwnowotworowego, ponieważ utrata prezentacji antygeny związanej z MHC przez komórki nowotworowe jest głównym mechanizmem ucieczki nowotworu spod nadzoru układu immunologicznego [57]. Ograniczeniem tej metody jest rozpoznawanie wyłącznie zewnątrzkomórkowych antygenów zlokalizowanych na powierzchni komórki nowotworowej przez receptory CAR-T [3]. Niektórzy naukowcy konstruują nowe limfocyty CAR-T z ekspresją chimerycznych receptorów kostymulujących (CCR, *chimeric co-stimulatory receptors*), które rozpoznają antygeny występujące w komórkach nowotworowych. Oznacza to, że ich aktywacja możliwa jest tylko wtedy, gdy wiążą się z dwoma lub trzema antygenami występującymi jednocześnie na komórkach nowotworowych [58–61]. Częsta przyczyna niepowodzenia terapii CAR-T to utrata docelowego antygeny, natomiast jednoczesna utrata dwóch antygenów jest dosyć rzadka. W rezultacie zaprojektowano bispecyficzne komórki CAR-T CD19-CD20, które skutecznie eliminują CD19-ujemne komórki przewlekłej białaczki limfocytowej (CLL, *chronic lymphocytic leukemia*) [62]. W przypadku komórek CD19-CD22 u pacjentów z nawrotem choroby zaobserwowano utratę lub obniżenie ekspresji obu antygenów, co wiązało się z przetrwaniem komórek nowotworowych mimo zastosowanej terapii [63, 64]. Kolejny problem stanowi ekspresja antygenów, przeciw którym skierowano odpowiedź CAR-T, również na zdrowych komórkach w organizmie. W celu poprawy bezpieczeństwa terapii opracowano hamujące chimeryczne receptory antygenowe (iCAR, *inhibitory chimeric antigen receptors*), zawierające cząsteczki białka programowanej śmierci komórki 1 (PD-1, *programmed cell death protein 1*) i białko 4 związane z cytotoksycznymi limfocytami T (CTLA-4, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*). Dzięki temu jeśli komórki iCAR trafią na zdrowe komórki, nie zostaną aktywowane [51, 65]. Modyfikację w działaniu limfocytów CAR-T można przeprowadzić na wiele sposobów, tj. przez blokadę cząsteczki PD-1 przeciwciałami monoklonalnymi anty-PD-1 lub przeciw ligandowi białka programowanej śmierci komórki 1 (anty-PD-L1 [*programmed*

*cell death protein ligand 1*]), wydzielanie anty-PD-1 i anty PD-L1 przez limfocyty CAR-T lub zmienną ekspresję receptora PD-1. Ekspresję PD-1 można również regulować w dół za pomocą kasety lentiwirusowej shRNA (ang. *short hairpin RNA*) PD-1 lub można wygenerować CAR-T z niedoborem PD-1 przy użyciu programowalnych endonukleaz do edycji genomu [66–68]. W protokołach generowania limfocytów CAR-T specyficznych dla CD19 z niedoborem PD-1 wykorzystuje się nowoczesne techniki inżynierii genetycznej, między innymi metodę CRISPR/Cas9 [68]. Dzięki strategii multipleksowania z edycją opartą na CRISPR/Cas9 możliwe jest jednoczesne dostarczenie letinowirusowego CAR oraz edytowanie wielu genów w celu regulacji ekspresji, między innymi TCR, ludzkie antygeny leukocytarne I (HLA-I, *human leukocyte antigens I*), PD-1 i CTLA-4 [66, 67].

Terapie z wykorzystaniem autologicznych limfocytów CAR-T mają ogromny potencjał terapeutyczny, jednak koszt, czas trwania oraz złożoność procedury nadal pozostają problemem uniemożliwiającym upowszechnienie metody [3]. W związku z tym trwają badania nad stworzeniem „uniwersalnych limfocytów CAR-T”. Komórki pochodzące od zdrowych dawców mogą stanowić rozwiązanie problemów związanych z zaburzeniami funkcji limfocytów T pobranych od chorych. Wykorzystuje się w tym przypadku technologię nukleaz efektorowych podobnych do aktywatora transkrypcji (TALEN, *transcription activator-like effector nuclease*) — nowoczesne narzędzie inżynierii genetycznej, które pozwala na wprowadzenie kilku dowolnych mutacji oraz precyzyjną edycję genów w komórkach niespokrewnionego dawcy. W konsekwencji metoda ta w połączeniu z transdukcją lentiwirusową CAR-T prowadzi do powstania genetycznie zmodyfikowanych limfocytów UCART19, rozpoznających antygen CD19, pozbawionych powierzchniowych receptorów HLA oraz niewrażliwych na leki immunosupresyjne. Limfocyty UCART19 precyzyjnie rozpoznają komórki nowotworowe, nie zostają odrzucone przez organizm biorcy oraz możliwe jest ich równoległe wykorzystanie z rutynowo stosowaną terapią, na przykład przeciwciałami anty-CD52 [3, 66, 69, 70].

### Genetyczne aspekty terapii CAR-T

Terapia genowa stwarza możliwość leczenia chorób, które są odporne na metody konwencjonalne. Celem terapii genowej jest uzyskanie trwałej ekspresji genu terapeutycznego lub „transgeny” na poziomie wystarczającym do złagodzenia lub wy-



leczenia objawów dolegliwości przy minimalnych zdarzeniach niepożądanych [71–73]. Istnieją dwie podstawowe strategie: wektor integrujący wprowadza się do komórki prekursorowej lub macierzystej, dzięki czemu gen zostaje przekazany do każdej komórki potomnej (wektor jest zaprojektowany do integracji w jednym lub większej liczbie *loci* w chromosomach pacjenta) lub gen jest dostarczany jako nieintegrujący się wektor do długo żyjącej postmitotycznej lub wolno dzielącej się komórki, zapewniającej ekspresję tego genu przez całe jej życie. W tym ostatnim przypadku integracja terapeutycznego DNA z chromosomami komórek pacjenta nie jest wymagana, zamiast tego przeniesiony DNA jest stabilizowany pozachromosomalnie. Transdukcja komórek macierzystych jest zasadniczo procesem *ex vivo* i wymaga wektora integrującego, natomiast dostarczanie do długo żyjących komórek postmitotycznych zwykle odbywa się poprzez dostarczenie genu *in vivo* z genem docelowym. Z jednej strony, modyfikowane komórki podaje się pacjentowi w takiej procedurze, jak stosowana w transplantacji komórek krwiotwórczych (choć w tym przypadku przeszczep składa się z autologicznych genetycznie zmodyfikowanych komórek). Z drugiej strony, dostarczanie genów *in vivo* przypomina podawanie innych rodzajów środków farmaceutycznych *in vivo*. Transgen (lub jego produkt białkowy) musi być dostarczony do tkanki lub tkanek docelowych oraz wykazywać stabilny poziom ekspresji, przy czym nie może zakłócać integralności funkcjonalnej tych komórek.

Badania nad przeniesieniem genu *in vivo*, w których wektor jest wstrzykiwany bezpośrednio pacjentowi, przeprowadzono w odniesieniu do chorób monogenowych z szeregiem nośników genowych. W większości przeprowadzonych badań stosuje się wektory towarzyszące adenowirusom (AAV, *adeno-associated virus*). Rekombinowany wektor AAV jest konstruowany z niepatogennego parwowirusa. Wektory są tworzone przez umieszczenie genu terapeutycznego z odpowiednim promotorem między dwoma niekodującymi wirusowymi sygnałami upakowania. Wydajność upakowania transgenów w wektorze zmniejsza się gwałtownie z sekwencjami dłuższymi niż 5 kb, co jest jednym z kilku ograniczeń systemu dostarczania wektora AAV. Większość DNA wektora AAV jest utrzymywana w komórce jako stabilny odcinek (nieintegrowany z genomem pacjenta). Ryzyko mutageny inercyjnej dla wektorów AAV pozostaje zatem niskie [71].

### Inżynieria genetyczna komórek T

Opracowanie nowych sposobów ingerencji w komórki nowotworowe stanowi postawę terapii celowanej u pacjentów z nowotworami hematologicznymi. Doskonałym przykładem są ukierunkowane limfocyty T modyfikowane genetycznie [73]. Fizjologicznie limfocyty T rozpoznają antygeny poprzez unikalny i specyficzny dla antygeny receptor komórek  $\alpha\beta$ -T (TCR), sprzyjają eliminacji docelowego antygeny (funkcja efektorowa) i wzmacniają odpowiedź, po uprzednim kontakcie z antygenem, poprzez rekrutację innych składników odpowiedzi immunologicznej (funkcja pomocnicza). Choć swoistość nowotworu można osiągnąć za pomocą przeciwciał monoklonalnych, to limfocyty T mają dodatkowe właściwości, które sprawiają, że warto stosować je klinicznie. Limfocyty T mają zdolność biologicznego rozkładu w tkankach i środowisku guza, a także możliwość ulegania potencjalnej ekspansji i samozachowawczości *in vivo*. Nowe, bispecyficzne przeciwciała mają również właściwości selektywnej swoistości antygenowej i aktywacji komórek T. Wyniki wstępnych badań klinicznych przedstawiają się obiecująco, jednak efekty przeciwnowotworowe zapewniane przez te cząsteczki mogą nie być długotrwałe, ponieważ limfocyty T nie wykazują specyficznej pamięci. Istnieje również obawa o potencjalną indukcję anergii limfocytów T, ponieważ rekrutowane limfocyty T nie otrzymują odpowiedniej, wspólnej stymulacji [72, 74, 75].

O ile wiele antygenów wirusowych jest wysoce immunogennych, a zatem indukuje silne przeciwwirusowe odpowiedzi limfocytów T, o tyle większość antygenów nowotworowych jedynie słabo stymuluje odpowiedź immunologiczną. Dlatego czynione są wysiłki zmierzające do zwiększenia liczby limfocytów T cytotoksycznych skierowanych przeciwko tym antygenom. Nadekspresja słabych antygenów przez profesjonalne komórki prezentujące antygen (APC, *antigen presenting cells*) może stanowić jeden ze sposobów wykorzystania transferu genów w celu przezwyciężenia tego problemu. Alternatywnym podejściem jest inżynieria genetyczna komórek T o pożądanej specyficzności, poszerzająca zakres antygenów do adoptywnej immunoterapii komórkami T [73, 76].

Celami wielu modyfikacji genetycznych są zwiększenie rozpoznawania antygenów nowotworowych, wzrost aktywności przeciwnowotworowej oraz zapobieganie nieprawidłowemu działaniu limfocytów T. Genetycznie zmodyfikowane limfocyty T mają dużą wartość dla podstawowej immunologii i immunoterapii eksperymentalnej [72, 73, 77].



Intensyfikacja proliferacji i funkcji limfocytów T jest możliwa przez genetyczne manipulowanie komórkami w celu ekspresji zmodyfikowanych receptorów kostymulujących. Limfocyty T można genetycznie chronić przed czynnikami immunosupresyjnymi, takimi jak transformujący czynnik wzrostu  $\beta$ . Opcjonalna jest również modyfikacja genetyczna w celu uwzględnienia regulowanych mechanizmów apoptozy, co zapewnia bezpieczeństwo adoptywnej terapii tymi komórkami. Wyrażanie konstytutywnych lub indukowalnych markerów w limfocytach T umożliwia śledzenie migracji i aktywacji komórek nieinwazyjnymi technikami obrazowania [77]. Zmodyfikowane receptory mogą się zarówno wiązać z określonym docelowym antygenem, jak i aktywować genetycznie zmodyfikowany limfocyt T [78].

### Transfer genu do limfocytów T

Znanych jest kilka metod transferu genów do ludzkich limfocytów T za pomocą inżynierii genetycznej. Obecnie najczęstszymi strategiami przenoszenia genów są techniki wirusowe, wykorzystujące retrowirusy lub lentiwirusy, które umożliwiają uzyskanie trwałego transgenu kodującego ekspresję CAR. Stosowanie ich jest jednak niekorzystne, gdy występuje poważna toksyczność związana z terapią komórkami CAR-T [79–81]. Inną, niewirusową metodę stanowi elektroporacja mRNA charakteryzująca się przejściową ekspresją genu CAR. Potencjalnie uznaje się ją za bezpieczniejszą niż techniki wirusowe przy wprowadzaniu nowego transgenu [82]. Plazmidy DNA umieszcza się przez elektroporację lub nukleoporację w ludzkich limfocytach T. Następnie — w oparciu o uprzednią, jednoczesną aplikację towarzyszących genów oporności na lek — separuje się transgeniczne komórki T. Podejście to wiąże się ze stosunkowo niskimi kosztami, jednak wykazuje niezbyt wysoki poziom skuteczności, ponieważ „nagie” DNA integruje się tylko w bardzo niewielkiej ilości z limfocytami T. W rezultacie potrzeba kilku tygodni hodowli, aby osiągnąć wystarczającą liczbę zmodyfikowanych komórek T odpowiednich do użytku klinicznego. Długotrwała hodowla może znacznie upośledzić ich zdolność do przetrwania *in vivo*. Ponadto włączenie genów kodujących oporność na antybiotyki w limfocytach T może generować immunogenność wytwarzanych białek, z przedwczesną eliminacją tych komórek *in vivo* [74, 83].

Geny mogą być transferowane za pomocą wektorów gammaretrowirusowych, stosowanych w większości badań. Niewątpliwą zaletą stanowi możliwość wytwarzania wektorów na szeroką

skalę. Zapewniają one stabilną integrację z genomem limfocytów T i ich komórkami potomnymi, utworzonymi przez podział komórkowy. Obecnie główne obawy związane ze stosowaniem tych wirusów wynikają z ryzyka generowania kompetentnych retrowirusów replikacyjnych (RCR, *rolling circle replication*) i mutagenezy insercyjnej. Nowoczesne linie komórek pakujących znacznie obniżyły ryzyko generowania RCR, co potwierdzono w niedawnej obszernej analizie ponad 800 różnych próbek. Wszystkie pobrane próbki były wolne od zanieczyszczeń RCR [84]. Ostatnio wektorów lentiwirusowych użyto również do inżynierii limfocytów T u pacjentów z ujemnym wynikiem testu na obecność ludzkiego wirusa nabytego niedoboru odporności (HIV, *human immunodeficiency virus*). Wektory te są szczególnie przydatne, gdy musi zostać zachowany mniej zróżnicowany fenotyp limfocytów T. Wyjątkowa zdolność do infekowania limfocytów T, nawet po minimalnej aktywacji, różni je od wektorów gammaretrowirusowych. Niestety, produkcja wektorów lentiwirusowych na dużą skalę jest problematyczna.

Nowe niewirusowe metody dostarczania genów do komórek są oparte na systemach transpozon/transpozaza (*Sleeping Beauty* i *piggyBac*) [85, 86], które mają wyższy wskaźnik integracji niż „nagie” DNA i pozwalają na insercję większych fragmentów DNA niż wiele wektorów wirusowych. Badania kliniczne, w których wykorzystano strategię opartą na *Sleeping Beauty* do genetycznej modyfikacji limfocytów T za pomocą chimerycznego receptora antygenowego, zostały zatwierdzone przez FDA [74]. Jednoczesne pojawienie się skutecznych technologii transferu genów, takich jak mysie wektory retrowirusowe i lentiwirusowe związane z HIV, umożliwiło nadanie limfocytom T nowej swoistości antygenowej poprzez przeniesienie CAR o stabilnej, długoterminowej ekspresji. Technologię tę użyto do wygenerowania limfocytów T specyficznych dla HIV i analogicznych, specyficznych ludzkich antygenów nowotworowych. Niektóre z nich przetestowano w badaniach I/II fazy u ludzi, wykazując wykonalność oraz względne bezpieczeństwo tego podejścia [42, 78, 87, 88].

Wektory lentiwirusowe mają zdolność przenoszenia genów do aktywowanych ludzkich limfocytów T CD4+ i CD8+ z wysoką wydajnością. Ekspresja transgenu kodowanego przez wektor zależy od wewnętrznego promotora, który kieruje jego transkrypcją. Udana ekspresja CAR i terapie genowe z limfocytami T wykazującymi ekspresję CAR zależą od zdolności limfocytów T do utrzymania nieustannej ekspresji receptora przez

określony czas. Badaniom poddano kilka promotorów, aby zidentyfikować ten o najwyższej stabilnej ekspresji w komórkach T zarówno CD4+, jak i CD8+ [45, 89]. Transdukcję przeprowadzono przy niewielkim rozcieńczeniu, aby zapewnić każdej komórce pojedynczy zintegrowany z nią wektor. Wykazano, że promotor EF-1 $\alpha$  spełnia określone warunki włączenia do wszystkich przyszłych badań z użyciem CAR. Wielokrotne stosowanie wektorów lentiwirusowych do transdukcji powoduje, że receptory CAR wykazują wysoką ekspresję (> 85%) na ludzkich limfocytach T. Analiza techniką *Western blotting* — zarówno w warunkach redukujących, jak i nieredukujących — dowiodła, że CAR są obecne nie tylko jako kowalencyjne dimery, ale również jako monomery w limfocytach T. Uzyskanie ponad 50-krotnej ekspansji limfocytów CAR-T+ w trakcie transdukcji oraz dalsza eskalacja trwająca do 10 dni są możliwe dzięki korzystaniu ze sztucznego systemu komórek prezentujących antygen, opartego na kulkach [45, 90].

Wlew limfocytów dawcy (DLI, *donor lymphocyte infusion*) stanowi najprostszą formę immunoterapii opartej na limfocytach T po przeszczepieniu allogenicznych krwiotwórczych komórek macierzystych (allo-HSCT, *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*). Limfocyty te wywołały całkowitą remisję u pacjentów z nawrotową przewlekłą białaczką szpikową (CML, *chronic myelogenous leukemia*) i innymi nowotworami hematologicznymi [73, 91, 92]. Jednak efekt przeszczep przeciw białaczce (GvL, *graft-versus-leukemia effect*), w którym pośredniczą limfocyty T, często koreluje z bardziej uogólnioną i niepożądaną reakcją immunologiczną w organizmie biorcy przeszczepu, czyli chorobę przeszczep przeciw gospodarzowi (GvHD, *graft-versus-host disease*). To powikłanie pozostaje główną przyczyną zachorowalności i umieralności, szczególnie jeśli DLI uzyskuje się od dawców, którzy nie są rodzeństwem wykazującym zgodność w układzie HLA z biorcą [93].

Nowoczesne podejście obejmuje modyfikację genetyczną limfocytów dawcy w celu włączenia genu samobójczego umożliwiającego ich szybką eliminację po wystąpieniu ciężkiej postaci GvHD. Badanie z wykorzystaniem transferu genu enzymu kinazy tymidynowej, pochodzącego z wirusa opryszczki zwykłej (HSV-TK, *herpes simplex virus-thymidine kinase*), weszło w III fazę badań klinicznych. Wirus ten fosforyluje analogi nukleozydowe, które ostatecznie hamują syntezę DNA, zabijając w ten sposób dzielące się komórki. Gen wstawiono do limfocytów T, aby działał jako gen samobójczy w obecności gancyklowiru. Do tej

pory ponad 120 pacjentów otrzymało infuzję limfocytów T zmodyfikowanych za pomocą HSV-TK. Bezpieczeństwo transferu genów za pośrednictwem gammaretrowirusa do limfocytów T podkreśla brak wystąpienia działań niepożądanych u pacjentów po podaniu transgeny, w tym objawów związanych z mutagenezą insercyjną. Wystąpienie reakcji GvHD skutecznie kontrolowano, podając gancyklowir wszystkim pacjentom. Infuzja zmodyfikowanych limfocytów T za pomocą HSV-TK przyniosła istotne korzyści kliniczne. Poprawiła szybkość rekonstrukcji immunologicznej, która zwykle ulega opóźnieniu po haploidentycznym HSCT. Prawdopodobnie ma ona działanie przeciwbiałaczkowe. Niemniej jednak zastosowanie limfocytów T zmodyfikowanych HSV-TK ma pewne ograniczenia. Pierwszym mankamentem jest podawanie gancyklowiru pacjentom w celu zapobiegania reaktywacji lub leczenia wirusa cytomegalii (CMV, *cytomegalovirus*). Obecność leku w organizmie pacjenta może spowodować przedwczesną eliminację transgenicznych limfocytów T. Do kontrolowania choroby, powstałej w konsekwencji zakażenia CMV, potrzebne są alternatywne i potencjalnie bardziej toksyczne leki. Ponadto eliminacja przez gancyklowir limfocytów T zmodyfikowanych HSV-TK wymaga kilku dni. W rezultacie gen samobójczy może się cechować niską skutecznością w szybkim kontrolowaniu ciężkiej GvHD. Wreszcie, istnieją dowody na odpowiedź immunologiczną przeciw genowi HSV-TK, prowadzącą do eliminacji transgenicznych limfocytów T [74].

## Leczenie limfodeplecyjne

Leczenie docelowe poprzedza podanie chemioterapii pomostowej, by zapobiec gwałtownemu pogorszeniu się stanu pacjenta w trakcie 4–5-tygodniowej przerwy między leukaferazą a infuzją komórek CAR-T. Kolejnym etapem jest chemioterapia limfodeplecyjna, na przykład z zastosowaniem cyklofosfamidu i fludarabiny. Cytostatyki redukują liczbę limfocytów T w organizmie oraz, zwiększając uwalnianie cytokin IL-15 i IL-7, wspomagają namnażanie limfocytów CAR-T *in vivo* [13].

Zgodnie z charakterystyką produktu leczniczego aksykabtagencyloleucel infuzję poprzedza podanie *i.v.* cyklofosfamidu w dawce 500 mg/m<sup>2</sup> oraz fludarabiny w dawce 30 mg/m<sup>2</sup> w 5., 4. i 3. dniu przed rozpoczęciem terapii. Producent zaleca podanie 500–1000 mg paracetamolu doustnie (*p.o.*, *per os*) godzinę przed rozpoczęciem infuzji oraz od 12,5 mg do 25 mg difenhydraminy *i.v.* lub *p.o.* około 1 godzinę przed infuzją leku docelowego. Pojedynczy worek infuzyjny produktu Yescarta<sup>TM</sup> zawiera

68 ml zawiesiny limfocytów CAR-T. Docelowa dawka to  $2 \times 10^6$  limfocytów CAR-T/kg mc. (maks.  $2 \times 10^8$ /kg mc. limfocytów CAR-T dla pacjentów o masie ciała  $> 100$  kg) [94].

W leczeniu dorosłych pacjentów z nawrotowym/opornym DLBCL można wykorzystać również tisagenlecleucel. Infuzja preparatu Kymriah™ jest poprzedzona zastosowaniem schematu limfodeplecyjnego: fludarabiny w dawce  $25 \text{ mg/m}^2$  i cyklofosfamidu w dawce  $250 \text{ mg/m}^2$  podawanych *i.v.* przez 3 dni (2–11 dni przed leczeniem tisa-cel). Zgodnie z charakterystyką produktu leczniczego u pacjentów opornych na leczenie lub z ciężkim krwotocznym zapaleniem pęcherza moczowego cyklofosfamid zastępuje się dwudniowym podaniem bendamustyny w dawce  $90 \text{ mg/m}^2$ . Chemioterapię limfodeplecyjną można pominąć, jeśli liczba białych krwinek (WBC, *white blood count*) u pacjenta wynosi nie więcej niż  $1000$  komórek/ $\mu\text{l}$ . Pojedyncza dawka preparatu Kymriah™ zawiera od  $0,6$  do  $6,0 \times 10^8$  limfocytów CAR-T.

Przed podaniem tisagenlecleucelu chorym na ALL (przed 25. rz.) stosuje się schemat chemioterapii limfodeplecyjnej: fludarabinę *i.v.* w dawce  $30 \text{ mg/m}^2/\text{dobę}$  przez 4 dni i cyklofosfamid *i.v.* w dawce  $500 \text{ mg/m}^2/\text{dobę}$  przez 2 dni (2–14 dni przed podaniem tisa-cel). Alternatywę stanowi podanie cytarabiny ( $500 \text{ mg/m}^2/\text{d. i.v.}$  przez 2 dni) i etopozydu ( $150 \text{ mg/m}^2/\text{d. i.v.}$  przez 3 dni). Zaleca się, by 30–60 min przed infuzją stosować premedykację paracetamolem i difenhydraminą lub innym antagonistą H1. Pojedyncza dawka Kymriah™ zawiera  $0,2\text{--}5,0 \times 10^6$  limfocytów CAR-T/kg mc. u pacjentów o masie ciała do  $50$  kg lub  $0,1\text{--}2,5 \times 10^8$  limfocytów CAR-T u pacjentów o masie ciała powyżej  $50$  kg [95].

Pacjenci z nawrotowym lub opornym na leczenie MCL, po zabiegu leukaferazy, są poddawani chemioterapii limfodeplecyjnej: fludarabiną w dawce  $30 \text{ mg/m}^2$  i cyklofosfamidem w dawce  $500 \text{ mg/m}^2$  podawanymi 5., 4. i 3. dnia przed rozpoczęciem terapii. Infuzję brexucabtageneautoleucelu poprzedza premedykacja paracetamolem i defenhydraminą lub innym antagonistą H1. Tecartus™ zawiera  $68$  ml zawiesiny limfocytów CAR-T. Docelowa dawka stanowi  $2 \times 10^6$  limfocytów CAR-T/kg mc. (maks.  $2 \times 10^8$ /kg mc). Nie zaleca się stosowania steroidów przed żadnym z wyżej wymienionych schematów CAR-T, z wyjątkiem sytuacji zagrażających życiu [96].

### Działania niepożądane terapii CAR-T w praktyce klinicznej

Cechą charakterystyczną tej nowej, wysoce aktywnej immunoterapii jest nadmierna aktywa-

cja komórek T. Koreluje ona niekiedy nie tylko ze znacznie zwiększoną skutecznością, ale także z zauważalną toksycznością [36, 97]. Podobnie do wszystkich terapii przeciwnowotworowych metoda CAR-T niesie za sobą ryzyko niepokojących, a czasem śmiertelnych działań niepożądanych. Wśród nich najczęściej występują: ostra reakcja anafilaktyczna, zespół uwalniania cytokin (CRS, *cytokine release syndrome*) [48, 52], zespół encefalopatii związany z CAR-T (CRES, *CAR-T-related encephalopathy syndrome*) lub zespół neurotoksyczności związany z komórkami efektorowymi (INANS, *immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome*), ostrą reakcją anafilaktyczną, zespół lizy guza, toksyczność hematologiczną związaną z aplazją [98, 99].

W pewnym stopniu oczekiwano stymulacji immunologicznej, która bezpośrednio wiąże się wytworzeniem stanu zapalnego w odpowiedzi na dużą liczbę aktywowanych limfocytów CAR-T po ACT. Obserwowano jednak niepokojąco ciężki CRS [100, 101], określane mianem „burzy cytokinowej” [102]. W najcięższej postaci CRS ma wiele cech związanych z limfohistiocytozą hemofagocytarną (HLH, *hemophagocytic lymphohistiocytosis*) i zespołem aktywacji makrofagów (MAS, *macrophage activation syndrome*) [36, 97]. Cytokiny i markery zapalne, związane z cięższym przebiegiem CRS, których aktywność wzrasta, obejmują: białko C-reaktywne (CRP, *C-reactive protein*), ferrytynę, interferon gamma ( $\text{IFN-}\gamma$ ), IL-1, IL-2, rozpuszczalny sIL2R $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, czynnik martwicy nowotworów alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ , *tumor necrosis factor alpha*), granzym B, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów/makrofagów (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), rozpuszczalną gp130, białko zapalne makrofagów 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ , *macrophage inflammatory protein alpha*) i białko chemoatraktanta monocytów 1 (MCP-1, *monocyte chemoattractant protein 1*) [24, 52, 97]. Stwierdzono korelację między stężeniem CRP w surowicy a cięższym przebiegiem CRS. Naukowcy wnioskują, że stężenie CRP we krwi może służyć jako biomarker do określania, czy u pacjentów występuje ryzyko ciężkiego przebiegu CRS [4].

Rozległość zmian nowotworowych, wyjściowa małopłytkowość i podwyższone markery aktywacji śródbłonna, takie jak czynnik von Willebranda i angiopoetyna 2 (ANG2), korelują z nasileniem CRS oraz występowaniem ciężkiej neurotoksyczności związanej z komórkami CAR-T [19, 22, 24, 52]. Na podstawie stężenia cytokin w surowicy opracowano schematy prognozowania ciężkiego przebiegu CRS i toksyczności neurologicznej, których zastosowa-



nie może się przyczynić zahamowania niepożądanych zjawisk już na wczesnym etapie [52]. Pacjenci z ciężką neurotoksycznością, oprócz podwyższonej aktywacji śródbłonna, wykazywali również objawy rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC, *disseminated intravascular coagulation*) czy zwiększoną przepuszczalność bariery krew–mózg (BBB, *blood–brain barrier*) [52, 103]. Dodatkowo obserwowano podwyższone stężenie białka w płynie mózgowo-rdzeniowym (CSF, *cerebrospinal fluid*), co także odzwierciedla zwiększoną przepuszczalność BBB. Zwiększona przepuszczalność BBB umożliwia natomiast przenikanie komórek CAR-T, które odpowiadają za nadmierną produkcję cytokin w CSF [52]. Dostosowanie dawki do poziomu zaawansowania choroby nowotworowej może złagodzić toksyczność. Zmniejszenie objętości komórek CAR-T we wlewie prawdopodobnie nie pogarsza skuteczności leczenia, ze względu na zwiększoną stymulację antygenem skorelowaną z proliferacją CAR-T, w odpowiedzi na wyższe obciążenie nowotworem [52, 104].

Komórki CAR-T wytwarzają odpowiednie środowisko cytokinowo-chemokinowe, bogate w przekazniki chemiczne indukujące rozwój zmasowanej reakcji odpornościowej [3, 4, 48, 105]. Wysokie stężenie cytokin w organizmie może aktywować układ prostaglandyn, wywołując objawy grypopodobne, w tym gorączkę, ból mięśni i zmęczenie (tab. 3). Hipercytokinemia prowadzi do rozszerzenia naczyń z późniejszym gwałtownym obniżeniem ciśnienia tętniczego, tachykardią i przeciekaniem włósniczkowym z towarzyszącym obrzękiem, czego skutkiem jest uszkodzenie narządów, w tym wątroby, nerek oraz zaburzenia układu krwionośnego [4, 99, 103].

Potencjalnie zagrażające życiu powikłania CRS obejmują dysfunkcję serca, zespół ostrej niewydolności oddechowej u dorosłych, toksyczność neurologiczną, niewydolność nerek i/lub wątroby oraz DIC. Szczególnie niepokojąca jest dysfunkcja serca, która może mieć nagły i ciężki początek, ale zazwyczaj jest odwracalna [48]. Patofizjologia ostrej kardiomiopatii w przebiegu CRS nie jest jasna, ale przypomina kardiomiopatię związaną z posocznicą [106] i kardiomiopatię indukowaną stresem (zespół takotsubo) [107]. U pacjentów może wystąpić silny wstrząs, oporny na podaż płynów i wymagający wsparcia wazoaktywnego w dużych dawkach, w celu utrzymania perfuzji tkanek [4, 99, 103]. Podobnie jak w HLH lub MAS można zaobserwować cytopenię, powiększenie wątroby i śledziony, koagulopatię z wyraźną hipofibrinogenią i hiperferrynemią [99]. W leczeniu CRS istotna jest wczesna identyfikacja stopnia ciężkości zespołu. Podstawy oceny to stopień hipoksemii, niestabilność hemodynamiczna, uszkodzenie organów i obecność chorób współistniejących [10]. Najczęściej stosowaną skalę ciężkości CRS opracował Narodowy Instytut Nowotworów (NCI, *National Cancer Institute*) [108]. Stopnie 3. i 4. (tab. 4) wymagają leczenia immunosupresyjnego. Zazwyczaj leczenie odbywa się na oddziale intensywnej terapii (OIT) z wykorzystaniem amin presyjnych, leków antycytokinowych i glikokortykoidoesteroidów, tocilizumabu (przeciwciało anti-IL-6) i siltuximabu (przeciwciało anti-IL-6). Ważnym objawem poprzedzającym wystąpienie CRS jest gorączka, wymagająca jednak różnicowania z rozwijającą się infekcją. Zespół uwalniania cytokin o łagodnym nasileniu leczony jest tylko objawowo [48].

**Tabela 3.** Symptomatologia objawów związanych z zespołem uwalniania cytokin (CRS) (na podstawie [48])

**Table 3.** Symptomatology of symptoms associated with cytokine release syndrome (CRS) (according to [48])

Lokalizacja	Kliniczne objawy przedmiotowe i podmiotowe
Objawy ogólne	Gorączka ± dreszcze, złe samopoczucie, zmęczenie, anoreksja, bóle mięśni, bóle stawów, nudności, wymioty, ból głowy
Skóra	Wysypka
Układ pokarmowy	Nudności, wymioty, biegunka
Układ oddechowy	Płytki oddech i zwiększenie częstości oddechu, hipoksemia, niewydolność oddechowa
Układ sercowo-naczyniowy	Tachykardia, wysokie wartości ciśnienia tętna, hipotensja, początkowo zwiększona pojemność minutowa serca, następnie zmniejszona pojemność minutowa serca (późna)
Układ krzepnięcia	Podwyższone stężenie D-dimerów, hipofibrinogenemia ± krwawienie
Układ moczowy	Azotemia
Wątroba	Zapalenie wątroby, hiperbilirubinemia
Układ nerwowy	Ból głowy, zaburzenia świadomości, splątanie, majaczenie, trudności w znajdowaniu słów lub afazja całkowita, omamy, drżenie, dysmetria, zaburzenia chodu, drgawki



**Tabela 4.** Skala oceny ciężkości zespołu uwalniania cytokin (CRS) opracowana przez Narodowy Instytut Nowotworów (NCI) (na podstawie [48, 108])

**Table 4.** The grading scheme for the severity of cytokine release syndrome (CRS) was developed by the National Cancer Institute (NCI) (according to [48, 108])

Stopień	Objawy kliniczne i leczenie
1.	Objawy niezagrażające życiu (gorączka, nudności, zmęczenie, ból głowy, bóle mięśniowe i inne) — leczenie objawowe
2.	Hipotensja leczona płynoterapią i małą dawką amin presyjnych Uszkodzenie narządowe 2. stopnia
3.	Objawy wymagające intensywnego leczenia Wstrząs leczony dużymi dawkami lub kilkoma rodzajami amin presyjnych Hipoksja leczona > 40-proc. FiO <sub>2</sub> Uszkodzenie narządowe 3. stopnia, transaminazemia 4. stopnia
4.	Wentylacja mechaniczna Uszkodzenie narządowe 4. stopnia Objawy zagrażające życiu
5.	Zgon

Chemioterapia kondycjonująca, która poprzedza infuzję limfocytów CAR-T, przyczynia się do rozwoju niedokrwistości, trombocytopenii, neutropenii. Toksyczność hematologiczna może również wynikać bezpośrednio z leczenia komórkami CAR-T [23, 109–111]. Inny, oczekiwany efekt niepożądany stanowi deplecja limfocytów B z ekspresją markera CD19, w przypadku odpowiedzi skierowanej przeciwko tej cząsteczce. Apłazja komórek zdrowych z ekspresją tego markera prowadzi do hipogammaglobulinemii wymagającej stosowania suplementacji immunoglobulin, które zapewniają im niezbędne przeciwciała do zwalczania patogenów [23, 99, 110, 111]. Toksyczność neurologiczna jest różnorodna i obejmuje encefalopatię, wady poznawcze, dysfaję, splątanie, majaczenie, halucynacje wzrokowe, drgawki i obrzęk mózgu. Zaleca się przeprowadzenie badań obrazowych, pobranie CSF i wykonanie elektroencefalografii (EEG) w celu wykluczenia innych przyczyn [3, 4, 48, 52, 105]. W większości przypadków powikłania neurologiczne ustępują samoistnie. Przebieg kliniczny jest heterogeny: od krótkotrwałych i odwracalnych działań niepożądanych do potencjalnie śmiertelnej neurotoksyczności, w tym obrzęku mózgu [3, 103]. Ciężki przebieg wymaga natychmiastowej opieki i terapii immunosupresyjnej. Ze względu na zwiększoną penetrację przez BBB sugeruje się stosowanie deksametazonu (0,5 mg/kg mc.; maks. dawka 10 mg *i.v.* co 6 h) [48]. Wagę i krytyczny

charakter obserwowanego zjawiska podkreśla fakt, że zgłaszano zgony z powodu zarówno CRS, jak i toksyczności neurologicznej [52].

Wykazano, że ciężkie przypadki CRS charakteryzują się wysokim stężeniem IL-6, wydzielanej przez makrofagi i limfocyty T, w odpowiedzi na zapalenie. Tocilizumab, humanizowane przeciwciało monoklonalne IgG1, wiąże się z receptorami, zarówno rozpuszczalnymi, jak i związanymi z błonami komórkowymi interleukiny 6 (IL-6R) [48, 103, 112]. W prowadzonych badaniach klinicznych u pacjentów z ciężką postacią CRS tocilizumab cechuje się skutecznością do 69%, minimalizując negatywne działanie IL-6, łagodząc gorączkę i hipotensję u większości pacjentów. Zalecana dawka wynosi 4 mg/kg mc. u dorosłych oraz 8 mg/kg mc. u dzieci, natomiast dawka maksymalna 800 mg może być powtarzana co 8 godzin [108]. Do działań niepożądanych leku zalicza się transaminazemię, trombocytopenię i hipercholesterolemię [48]. Niekiedy, ze względu na brak poprawy stanu ogólnego, konieczna jest dodatkowa immunosupresja za pomocą kortykosteroidów. Kortykosteroidy mogą zaburzać aktywność limfocytów CAR-T, szczególnie w dużych dawkach [101], a więc są przeznaczone do stosowania w przypadku opornego na leczenie CRS [52]. Zalecana dawka początkowa metyloprednizolonu to 2 mg/kg mc./dobę [48]. W przypadkach HLH występującego z CRS można rozważyć dodanie etopozydu [113]. Tocilizumab wykazuje słabą penetrację do CSF, dlatego stwierdza się jego ograniczoną skuteczność w zapobieganiu neurotoksyczności [19, 52, 103, 114]. W przypadku nieskutecznego działania tocilizumabu i glikokortykosteroidów można rozważyć zaaplikowanie leków stosowanych w leczeniu MAS, tj. infliksymabu, etanerceptu czy anakinry (antagonista ludzkich receptorów IL-1) [48].

## Podsumowanie

Nowoczesne schematy chemioterapii i opieka wspomagająca przynoszą znaczącą, jednakże niewystarczającą poprawę ogólnego przeżycia pacjentów z nowotworami hematologicznymi. Zastosowanie limfocytów T z ekspresją CAR wydaje się skuteczną alternatywą. Innowacyjna metoda CAR-T umożliwiła stałą kontrolę nad progresją nowotworu lub uzyskanie długotrwałych remisji, co znajduje swoje potwierdzenie w praktyce klinicznej. Rozwój metodologii, obejmujący edycję oraz transfer genów do ludzkich limfocytów T, opracowanie strategii hodowli komórkowych, identyfikację nowych celów, racjonalną terapię

wspomagającą, wybór biomarkerów, zapobieganie wysokiej toksyczności oraz nowatorskie podejście do konstruowania komórek CAR, stanowi szansę na dalszą poprawę rokowania chorych na nowotwory hematologiczne.

### Konflikt interesów

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

### Piśmiennictwo

- Minn IL, Rowe SP, Pomper MG. Enhancing CAR T-cell therapy through cellular imaging and radiotherapy. *Lancet Oncol.* 2019; 20(8): e443–e451, doi: [10.1016/S1470-2045\(19\)30461-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30461-9), indexed in Pubmed: [31364596](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31364596/).
- Ghione P, Moskowitz AJ, De Paola NEK, et al. Novel immunotherapies for T cell lymphoma and leukemia. *Curr Hematol Malig Rep.* 2018; 13(6): 494–506, doi: [10.1007/s11899-018-0480-8](https://doi.org/10.1007/s11899-018-0480-8), indexed in Pubmed: [30317410](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30317410/).
- June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science.* 2018; 359(6382): 1361–1365, doi: [10.1126/science.aar6711](https://doi.org/10.1126/science.aar6711), indexed in Pubmed: [29567707](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29567707/).
- Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016; 13(6): 370–383, doi: [10.1038/nrclinonc.2016.36](https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.36), indexed in Pubmed: [27000958](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27000958/).
- Zhang X, Li JJ, Lu PH. Advances in the development of chimeric antigen receptor-T-cell therapy in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Chin Med J (Engl).* 2020; 133(4): 474–482, doi: [10.1097/CM9.0000000000000638](https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000638), indexed in Pubmed: [31977556](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31977556/).
- Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, 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): 4099–4102, doi: [10.1182/blood-2010-04-281931](https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-281931), indexed in Pubmed: [20668228](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20668228/).
- Sommermeier D, Hill T, Shamah SM, et al. Fully human CD19-specific chimeric antigen receptors for T-cell therapy. *Leukemia.* 2017; 31(10): 2191–2199, doi: [10.1038/leu.2017.57](https://doi.org/10.1038/leu.2017.57), indexed in Pubmed: [28202953](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28202953/).
- Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. Primary analysis of Juliet: a global, pivotal, phase 2 trial of CTL019 in adult patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2017; 130(Suppl 1): 577.
- Schuster SJ, Bishop M, Tam C, et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2019; 380(1): 45–56, doi: [10.1056/nejmoa1804980](https://doi.org/10.1056/nejmoa1804980).
- Chavez JC, Bachmeier C, Kharfan-Dabaja MA. CAR T-cell therapy for B-cell lymphomas: clinical trial results of available products. *Ther Adv Hematol.* 2019; 10: 2040620719841581, doi: [10.1177/2040620719841581](https://doi.org/10.1177/2040620719841581), indexed in Pubmed: [31019670](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31019670/).
- Braendstrup P, Levine BL, Ruella M. The long road to the first FDA-approved gene therapy: chimeric antigen receptor T cells targeting CD19. *Cytotherapy.* 2020; 22(2): 57–69, doi: [10.1016/j.jcyt.2019.12.004](https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.12.004), indexed in Pubmed: [32014447](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32014447/).
- Laetsch TW, Myers GD, Baruchel A, et al. Patient-reported quality of life after tisagenlecleucel infusion in children and young adults with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukaemia: a global, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2019; 20(12): 1710–1718, doi: [10.1016/S1470-2045\(19\)30493-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30493-0), indexed in Pubmed: [31606419](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31606419/).
- Roex G, Feys T, Beguin Y, et al. Chimeric antigen receptor-T-cell therapy for B-cell hematological malignancies: an update of the pivotal clinical trial data. *Pharmaceutics.* 2020; 12(2), doi: [10.3390/pharmaceutics12020194](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020194), indexed in Pubmed: [32102267](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32102267/).
- Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, et al. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol.* 2019; 20(1): 31–42, doi: [10.1016/S1470-2045\(18\)30864-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30864-7), indexed in Pubmed: [30518502](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30518502/).
- Maziarz RT, Waller EK, Jaeger U, et al. Patient-reported long-term quality of life after tisagenlecleucel in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Adv.* 2020; 4(4): 629–637, doi: [10.1182/bloodadvances.2019001026](https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001026), indexed in Pubmed: [32074277](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32074277/).
- Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, et al. Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 2017; 377(26): 2545–2554, doi: [10.1056/NEJMoa1708566](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1708566), indexed in Pubmed: [29226764](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29226764/).
- Voelker R. CAR-T therapy is approved for mantle cell lymphoma. *JAMA.* 2020; 324(9): 832, doi: [10.1001/jama.2020.15456](https://doi.org/10.1001/jama.2020.15456), indexed in Pubmed: [32870282](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32870282/).
- Wang M, Munoz J, Goy A, et al. KTE-X19 CAR T-cell therapy in relapsed or refractory mantle-Cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2020; 382(14): 1331–1342, doi: [10.1056/NEJMoa1914347](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1914347), indexed in Pubmed: [32242358](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32242358/).
- Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest.* 2016; 126(6): 2123–2138, doi: [10.1172/JCI85309](https://doi.org/10.1172/JCI85309), indexed in Pubmed: [27111235](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27111235/).
- Turtle CJ, Hay KA, Hanafi LA, et al. Durable molecular remissions in chronic lymphocytic leukemia treated with CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells after failure of ibrutinib. *J Clin Oncol.* 2017; 35(26): 3010–3020, doi: [10.1200/JCO.2017.72.8519](https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.8519), indexed in Pubmed: [28715249](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28715249/).
- Cheadle EJ, Sheard V, Hombach AA, et al. Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy. *Methods Mol Biol.* 2012; 907: 645–666, doi: [10.1007/978-1-61779-974-7\\_36](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-974-7_36), indexed in Pubmed: [22907378](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22907378/).
- Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med.* 2013; 5(177): 177ra38, doi: [10.1126/scitranslmed.3005930](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005930), indexed in Pubmed: [23515080](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23515080/).
- Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet.* 2015; 385(9967): 517–528, doi: [10.1016/S0140-6736\(14\)61403-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61403-3), indexed in Pubmed: [25319501](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25319501/).
- Maude SL, Frey N, Shaw P, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med.* 2014; 371(16): 1507–1517, doi: [10.1056/nejmoa1407222](https://doi.org/10.1056/nejmoa1407222).
- Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther.* 2015; 15(8): 1145–1154, doi: [10.1517/14712598.2015.1046430](https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1046430), indexed in Pubmed: [25985798](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25985798/).
- Lorentzen CL, Straten PT. CD19-chimeric antigen receptor T cells for treatment of chronic lymphocytic leukaemia and Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Scand J Immunol.* 2015; 82(4): 307–319, doi: [10.1111/sji.12331](https://doi.org/10.1111/sji.12331), indexed in Pubmed: [26099639](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26099639/).
- Yu S, Li A, Liu Q, et al. Chimeric antigen receptor T cells: a novel therapy for solid tumors. *J Hematol Oncol.* 2017; 10(1): 78, doi: [10.1186/s13045-017-0444-9](https://doi.org/10.1186/s13045-017-0444-9), indexed in Pubmed: [28356156](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28356156/).
- Zhang E, Xu H. A new insight in chimeric antigen receptor-engineered T cells for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol.* 2017; 10(1): 1, doi: [10.1186/s13045-016-0379-6](https://doi.org/10.1186/s13045-016-0379-6), indexed in Pubmed: [28049484](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28049484/).
- Almäsbaq H, Walseng E, Kristian A, et al. Inclusion of an IgG1-Fc spacer abrogates efficacy of CD19 CAR T cells in a xenograft mouse model. *Gene Ther.* 2015; 22(5): 391–403, doi: [10.1038/gt.2015.4](https://doi.org/10.1038/gt.2015.4), indexed in Pubmed: [25652098](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25652098/).

30. Hudecek M, Sommermeyer D, Kosasih PL, et al. The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. *Cancer Immunol Res.* 2015; 3(2): 125–135, doi: [10.1158/2326-6066.CIR-14-0127](https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0127), indexed in Pubmed: [25212991](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25212991/).
31. Jonnalagadda M, Mardiros A, Urak R, et al. Chimeric antigen receptors with mutated IgG4 Fc spacer avoid fc receptor binding and improve T cell persistence and antitumor efficacy. *Mol Ther.* 2015; 23(4): 757–768, doi: [10.1038/mt.2014.208](https://doi.org/10.1038/mt.2014.208), indexed in Pubmed: [25366031](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25366031/).
32. Zou Y, Xu W, Li J. Chimeric antigen receptor-modified T cell therapy in chronic lymphocytic leukemia. *J Hematol Oncol.* 2018; 11(1): 130, doi: [10.1186/s13045-018-0676-3](https://doi.org/10.1186/s13045-018-0676-3), indexed in Pubmed: [30458878](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30458878/).
33. Kojima R, Aubel D, Fussenegger M. Building sophisticated sensors of extracellular cues that enable mammalian cells to work as “doctors” in the body. *Cell Mol Life Sci.* 2020; 77(18): 3567–3581, doi: [10.1007/s00018-020-03486-y](https://doi.org/10.1007/s00018-020-03486-y), indexed in Pubmed: [32185403](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32185403/).
34. Sermer D, Brentjens R. CAR T-cell therapy: full speed ahead. *Hematol Oncol.* 2019; 37(Suppl 1): 95–100, doi: [10.1002/hon.2591](https://doi.org/10.1002/hon.2591), indexed in Pubmed: [31187533](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31187533/).
35. Porter DL, Levine BL, Kalos M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2011; 365(8): 725–733, doi: [10.1056/NEJMoa1103849](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103849), indexed in Pubmed: [21830940](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21830940/).
36. Maude SL, Barrett D, Teachey DT, et al. Managing cytokine release syndrome associated with novel T cell-engaging therapies. *Cancer J.* 2014; 20(2): 119–122, doi: [10.1097/PPO.0000000000000035](https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000035), indexed in Pubmed: [24667956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24667956/).
37. Savoldo B, Ramos CA, Liu E, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest.* 2011; 121(5): 1822–1826, doi: [10.1172/JCI46110](https://doi.org/10.1172/JCI46110), indexed in Pubmed: [21540550](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21540550/).
38. Zhou X, Di Stasi A, Tey SK, et al. Long-term outcome after haploidentical stem cell transplant and infusion of T cells expressing the inducible caspase 9 safety transgene. *Blood.* 2014; 123(25): 3895–3905, doi: [10.1182/blood-2014-01-551671](https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-551671), indexed in Pubmed: [24753538](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24753538/).
39. Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med.* 2011; 365(18): 1673–1683, doi: [10.1056/NEJMoa1106152](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1106152), indexed in Pubmed: [22047558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22047558/).
40. Jensen MC, Popplewell L, Cooper LJ, et al. Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16(9): 1245–1256, doi: [10.1016/j.bbmt.2010.03.014](https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.03.014), indexed in Pubmed: [20304086](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20304086/).
41. Lamers CHJ, Sleijfer S, Vulto AG, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J Clin Oncol.* 2006; 24(13): e20–e22, doi: [10.1200/JCO.2006.05.9964](https://doi.org/10.1200/JCO.2006.05.9964), indexed in Pubmed: [16648493](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16648493/).
42. Till BG, Jensen MC, Wang J, et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood.* 2008; 112(6): 2261–2271, doi: [10.1182/blood-2007-12-128843](https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-128843), indexed in Pubmed: [18509084](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18509084/).
43. Yang X, Wang GX, Zhou JF. CAR T cell therapy for hematological malignancies. *Curr Med Sci.* 2019; 39(6): 874–882, doi: [10.1007/s11596-019-2118-z](https://doi.org/10.1007/s11596-019-2118-z), indexed in Pubmed: [31845217](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31845217/).
44. Song DG, Ye Q, Poussin M, et al. CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells in vivo. *Blood.* 2012; 119(3): 696–706, doi: [10.1182/blood-2011-03-344275](https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-344275), indexed in Pubmed: [22117050](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22117050/).
45. Milone MC, Fish J, Carpenito C, et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Mol Ther.* 2009; 17(8): 1453–1464, doi: [10.1038/mt.2009.83](https://doi.org/10.1038/mt.2009.83), indexed in Pubmed: [19384291](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19384291/).
46. Nastoupil LJ, Jain MD, Feng L, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2017; 377(26): 2531–2544, doi: [10.1056/NEJMoa1707447](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707447), indexed in Pubmed: [29226797](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29226797/).
47. Abramson JS, Gordon L, Palomba M, et al. Updated safety and long term clinical outcomes in TRANSCEND NHL 001, pivotal trial of lisocabtagene maraleucel (JCAR017) in R/R aggressive NHL. *J Clin Oncol.* 2018; 36(15\_Suppl): 7505–7505, doi: [10.1200/jco.2018.36.15\\_suppl.7505](https://doi.org/10.1200/jco.2018.36.15_suppl.7505).
48. Lee DW, Gardner R, Porter DL, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood.* 2014; 124(2): 188–195, doi: [10.1182/blood-2014-05-552729](https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-552729), indexed in Pubmed: [24876563](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24876563/).
49. Carpenito C, Milone MC, Hassan R, et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(9): 3360–3365, doi: [10.1073/pnas.0813101106](https://doi.org/10.1073/pnas.0813101106), indexed in Pubmed: [19211796](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19211796/).
50. Zhong XS, Matsushita M, Plotkin J, et al. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8+ T cell-mediated tumor eradication. *Mol Ther.* 2010; 18(2): 413–420, doi: [10.1038/mt.2009.210](https://doi.org/10.1038/mt.2009.210), indexed in Pubmed: [19773745](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19773745/).
51. Redeker A, Arens R. Improving adoptive T cell therapy: the particular role of T cell costimulation, cytokines, and post-transfer vaccination. *Front Immunol.* 2016; 7: 345, doi: [10.3389/fimmu.2016.00345](https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00345), indexed in Pubmed: [27656185](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27656185/).
52. Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: mechanisms, manifestations and management. *Blood Rev.* 2019; 34: 45–55, doi: [10.1016/j.blre.2018.11.002](https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.11.002), indexed in Pubmed: [30528964](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30528964/).
53. Zhou X, Dotti G, Krance RA, et al. Inducible caspase-9 suicide gene controls adverse effects from alloplete T cells after haploidentical stem cell transplantation. *Blood.* 2015; 125(26): 4103–4113, doi: [10.1182/blood-2015-02-628354](https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-628354), indexed in Pubmed: [25977584](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25977584/).
54. Gargett T, Brown MP. The inducible caspase-9 suicide gene system as a „safety switch” to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Front Pharmacol.* 2014; 5: 235, doi: [10.3389/fphar.2014.00235](https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00235), indexed in Pubmed: [25389405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25389405/).
55. Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood.* 2012; 119(18): 4133–4141, doi: [10.1182/blood-2011-12-400044](https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-400044), indexed in Pubmed: [22354001](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22354001/).
56. Zhang L, Kerkar SP, Yu Z, et al. Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12 expression to the tumor environment. *Mol Ther.* 2011; 19(4): 751–759, doi: [10.1038/mt.2010.313](https://doi.org/10.1038/mt.2010.313), indexed in Pubmed: [21285960](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21285960/).
57. Garrido F, Aptsiauri N, Doorduyn EM, et al. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2016; 39: 44–51, doi: [10.1016/j.coi.2015.12.007](https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.12.007), indexed in Pubmed: [26796069](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26796069/).
58. Liu D, Zhao J, Song Y. Engineering switchable and programmable universal CARs for CAR T therapy. *J Hematol Oncol.* 2019; 12(1): 69, doi: [10.1186/s13045-019-0763-0](https://doi.org/10.1186/s13045-019-0763-0), indexed in Pubmed: [31272471](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31272471/).
59. Bielamowicz K, Fousek K, Byrd T, et al. Trivalent CAR T cells overcome interpatient antigenic variability in glioblastoma. *NeuroOncol.* 2017; 20(4): 506–518, doi: [10.1093/neuonc/nox182](https://doi.org/10.1093/neuonc/nox182), indexed in Pubmed: [29016929](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29016929/).
60. Sun J, Sadelain M. The quest for spatio-temporal control of CAR T cells. *Cell Res.* 2015; 25(12): 1281–1282, doi: [10.1038/cr.2015.131](https://doi.org/10.1038/cr.2015.131), indexed in Pubmed: [26575974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26575974/).



61. Kloss CC, Condomines M, Cartellieri M, et al. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat Biotechnol.* 2013; 31(1): 71–75, doi: [10.1038/nbt.2459](https://doi.org/10.1038/nbt.2459), indexed in Pubmed: [23242161](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23242161/).
62. Martyniszyn A, Krahl AC, André MC, et al. CD20-CD19 bispecific CAR T cells for the treatment of B-cell malignancies. *Hum Gene Ther.* 2017; 28(12): 1147–1157, doi: [10.1089/hum.2017.126](https://doi.org/10.1089/hum.2017.126), indexed in Pubmed: [29207878](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29207878/).
63. Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nat Med.* 2018; 24(1): 20–28, doi: [10.1038/nm.4441](https://doi.org/10.1038/nm.4441), indexed in Pubmed: [29155426](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29155426/).
64. Yates B, Shalabi H, Salem D, et al. Sequential CD22 targeting impacts CD22 CAR-T cell response. *Blood.* 2018; 132(Suppl 1): 282–282, doi: [10.1182/blood-2018-99-119621](https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-119621).
65. Fedorov VD, Themeli M, Sadelain M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Sci Transl Med.* 2013; 5(215): 215ra172, doi: [10.1126/scitranslmed.3006597](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006597), indexed in Pubmed: [24337479](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24337479/).
66. Yoon DH, Osborn MJ, Tolar J, et al. Incorporation of immune checkpoint blockade into chimeric antigen receptor T cells (CAR-Ts): combination or built-in CAR-T. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(2), doi: [10.3390/ijms19020340](https://doi.org/10.3390/ijms19020340), indexed in Pubmed: [29364163](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29364163/).
67. Ren J, Liu X, Fang C, et al. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. *Clin Cancer Res.* 2017; 23(9): 2255–2266, doi: [10.1158/1078-0432.CCR-16-1300](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1300), indexed in Pubmed: [27815355](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27815355/).
68. Rupp LJ, Schumann K, Roybal KT, et al. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 737, doi: [10.1038/s41598-017-00462-8](https://doi.org/10.1038/s41598-017-00462-8), indexed in Pubmed: [28389661](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28389661/).
69. Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Clin Oncol.* 2015; 33(6): 540–549, doi: [10.1200/JCO.2014.56.2025](https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.2025), indexed in Pubmed: [25154820](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25154820/).
70. Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med.* 2017; 9(374): eaaj2013, doi: [10.1126/scitranslmed.aaj2013](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaj2013), indexed in Pubmed: [28123068](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28123068/).
71. High KA, Roncarolo M. Gene therapy. *N Engl J Med.* 2019; 381(5): 455–464, doi: [10.1056/nejmra1706910](https://doi.org/10.1056/nejmra1706910), indexed in Pubmed: [31365802](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31365802/).
72. Sharpe M, Mount N. Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Dis Model Mech.* 2015; 8(4): 337–350, doi: [10.1242/dmm.018036](https://doi.org/10.1242/dmm.018036), indexed in Pubmed: [26035842](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26035842/).
73. Bonini C, Brenner MK, Heslop HE, et al. Genetic modification of T cells. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011; 17(1 Suppl): S15–S20, doi: [10.1016/j.bbmt.2010.09.019](https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.09.019), indexed in Pubmed: [21195304](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21195304/).
74. Hoyos V, Savoldo B, Dotti G. Genetic modification of human T lymphocytes for the treatment of hematologic malignancies. *Haematologica.* 2012; 97(11): 1622–1631, doi: [10.3324/haematol.2012.064303](https://doi.org/10.3324/haematol.2012.064303), indexed in Pubmed: [22929977](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22929977/).
75. Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, et al. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016; 13(6): 394, doi: [10.1038/nrclinonc.2016.65](https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.65), indexed in Pubmed: [27118494](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27118494/).
76. Rossig C, Brenner MK. Genetic modification of T lymphocytes for adoptive immunotherapy. *Mol Ther.* 2004; 10(1): 5–18, doi: [10.1016/j.ythe.2004.04.014](https://doi.org/10.1016/j.ythe.2004.04.014), indexed in Pubmed: [15233937](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15233937/).
77. Sadelain M, Rivière I, Brentjens R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(1): 35–45, doi: [10.1038/nrc971](https://doi.org/10.1038/nrc971), indexed in Pubmed: [12509765](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12509765/).
78. Geiger TL, Jyothi MD. Development and application of receptor-modified T lymphocytes for adoptive immunotherapy. *Transfus Med Rev.* 2001; 15(1): 21–34, doi: [10.1053/tmrv.2001.19949](https://doi.org/10.1053/tmrv.2001.19949), indexed in Pubmed: [11149976](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11149976/).
79. Gill S, June CH. Going viral: chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematological malignancies. *Immunol Rev.* 2015; 263(1): 68–89, doi: [10.1111/imr.12243](https://doi.org/10.1111/imr.12243), indexed in Pubmed: [25510272](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25510272/).
80. Dodo K, Chono H, Saito N, et al. An efficient large-scale retroviral transduction method involving preloading the vector into a RetroNectin-coated bag with low-temperature shaking. *PLoS One.* 2014; 9(1): e86275, doi: [10.1371/journal.pone.0086275](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086275), indexed in Pubmed: [24454964](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24454964/).
81. Casati A, Varghaei-Nahvi A, Feldman SA, et al. Clinical-scale selection and viral transduction of human naive and central memory CD8+ T cells for adoptive cell therapy of cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2013; 62(10): 1563–1573, doi: [10.1007/s00262-013-1459-x](https://doi.org/10.1007/s00262-013-1459-x), indexed in Pubmed: [23903715](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23903715/).
82. Zhao Y, Moon E, Carpenito C, et al. Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor. *Cancer Res.* 2010; 70(22): 9053–9061, doi: [10.1158/0008-5472.CAN-10-2880](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2880), indexed in Pubmed: [20926399](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20926399/).
83. Bunnell BA, Muul LM, Donahue RE, et al. High-efficiency retroviral-mediated gene transfer into human and nonhuman primate peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(17): 7739–7743, doi: [10.1073/pnas.92.17.7739](https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.7739), indexed in Pubmed: [7644487](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7644487/).
84. Bear AS, Morgan RA, Cornetta K, et al. Replication-competent retroviruses in gene-modified T cells used in clinical trials: is it time to revise the testing requirements? *Mol Ther.* 2012; 20(2): 246–249, doi: [10.1038/mt.2011.288](https://doi.org/10.1038/mt.2011.288), indexed in Pubmed: [22297819](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22297819/).
85. Singh H, Manuri PR, Olivares S, et al. Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the Sleeping Beauty system. *Cancer Res.* 2008; 68(8): 2961–2971, doi: [10.1158/0008-5472.CAN-07-5600](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5600), indexed in Pubmed: [18413766](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18413766/).
86. Nakazawa Y, Huye LE, Dotti G, et al. Optimization of the Piggy-Bac transposon system for the sustained genetic modification of human T lymphocytes. *J Immunother.* 2009; 32(8): 826–836, doi: [10.1097/CJI.0b013e3181ad762b](https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e3181ad762b), indexed in Pubmed: [19752751](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19752751/).
87. Deeks SG, Wagner B, Anton PA, et al. A phase II randomized study of HIV-specific T-cell gene therapy in subjects with undetectable plasma viremia on combination antiretroviral therapy. *Mol Ther.* 2002; 5(6): 788–797, doi: [10.1006/mthe.2002.0611](https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0611), indexed in Pubmed: [12027564](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12027564/).
88. Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(20 Pt 1): 6106–6115, doi: [10.1158/1078-0432.CCR-06-1183](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1183), indexed in Pubmed: [17062687](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17062687/).
89. Finney HM, Akbar AN, Lawson ADG. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J Immunol.* 2004; 172(1): 104–113, doi: [10.4049/jimmunol.172.1.104](https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.104), indexed in Pubmed: [14688315](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14688315/).
90. Imai C, Mihara K, Andreansky M, et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2004; 18(4): 676–684, doi: [10.1038/sj.leu.2403302](https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403302), indexed in Pubmed: [14961035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14961035/).
91. Dazzi F, Szydlo RM, Goldman JM. Donor lymphocyte infusions for relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplant: where we now stand. *Exp Hematol.* 1999; 27(10): 1477–1486, doi: [10.1016/s0301-472x\(99\)00096-x](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(99)00096-x), indexed in Pubmed: [10517488](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10517488/).



92. Mandigers CM, Verdonck LF, Meijerink JPP, et al. Graft-versus-lymphoma effect of donor lymphocyte infusion in indolent lymphomas relapsed after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 32(12): 1159–1163, doi: [10.1038/sj.bmt.1704290](https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1704290), indexed in Pubmed: [14647270](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14647270/).
93. Frey NV, Porter DL. Graft-versus-host disease after donor leukocyte infusions: presentation and management. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008; 21(2): 205–222, doi: [10.1016/j.beha.2008.02.007](https://doi.org/10.1016/j.beha.2008.02.007), indexed in Pubmed: [18503987](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18503987/).
94. YESCARTA® [ulotka informacyjna]. Santa Monica, CA: Kite Pharma, Inc; 2019 [zaktualizowano 05.2020]. <https://www.fda.gov/media/108377/download> (September 12, 2020).
95. KYMRIA® [ulotka informacyjna]. East Hanover, New Jersey: Novartis Pharmaceuticals Corporation; 2017 [zaktualizowano 05.2018]. <https://www.fda.gov/files/vaccines%2C%20blood%20%26%20biologics/published/Package-Insert---KYMRIA.pdf>. (September 12, 2020).
96. TECARTUS® [ulotka informacyjna]. Santa Monica, CA: Kite Pharma, Inc; 2020. <https://www.fda.gov/media/140409/download> (September 12, 2020).
97. Barrett DM, Teachey DT, Grupp SA. Toxicity management for patients receiving novel T-cell engaging therapies. *Curr Opin Pediatr.* 2014; 26(1): 43–49, doi: [10.1097/MOP.0000000000000043](https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000043), indexed in Pubmed: [24362408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24362408/).
98. Wang Y, Zhang Wy, Han Qw, et al. Effective response and delayed toxicities of refractory advanced diffuse large B-cell lymphoma treated by CD20-directed chimeric antigen receptor-modified T cells. *Clin Immunol.* 2014; 155(2): 160–175, doi: [10.1016/j.clim.2014.10.002](https://doi.org/10.1016/j.clim.2014.10.002), indexed in Pubmed: [25444722](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25444722/).
99. Oved JH, Barrett DM, Teachey DT. Cellular therapy: Immune-related complications. *Immunol Rev.* 2019; 290(1): 114–126, doi: [10.1111/imir.12768](https://doi.org/10.1111/imir.12768), indexed in Pubmed: [31355491](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31355491/).
100. Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med.* 2011; 3(95): 95ra73, doi: [10.1126/scitranslmed.3002842](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002842), indexed in Pubmed: [21832238](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21832238/).
101. Davila ML, Riviere I, Wang X, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med.* 2014; 6(224): 224ra25, doi: [10.1126/scitranslmed.3008226](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008226), indexed in Pubmed: [24553386](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24553386/).
102. DeFrancesco L. CAR-T cell therapy seeks strategies to harness cytokine storm. *Nat Biotechnol.* 2014; 32(7): 604, doi: [10.1038/nbt0714-604](https://doi.org/10.1038/nbt0714-604), indexed in Pubmed: [25004212](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25004212/).
103. Gust J, Hay KA, Hanafi LA, et al. Endothelial activation and blood-brain barrier disruption in neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CD19 CAR-T cells. *Cancer Discov.* 2017; 7(12): 1404–1419, doi: [10.1158/2159-8290.CD-17-0698](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0698), indexed in Pubmed: [29025771](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29025771/).
104. Park JH, Riviere I, Gonen M, et al. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2018; 378(5): 449–459, doi: [10.1056/NEJMoa1709919](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709919), indexed in Pubmed: [29385376](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29385376/).
105. Chen H, Wang F, Zhang P, et al. Management of cytokine release syndrome related to CAR-T cell therapy. *Front Med.* 2019; 13(5): 610–617, doi: [10.1007/s11684-019-0714-8](https://doi.org/10.1007/s11684-019-0714-8), indexed in Pubmed: [31571160](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31571160/).
106. Romero-Bermejo FJ, Ruiz-Bailen M, Gil-Cebrian J, et al. Sepsis-induced cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rev.* 2011; 7(3): 163–183, doi: [10.2174/157340311798220494](https://doi.org/10.2174/157340311798220494), indexed in Pubmed: [22758615](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22758615/).
107. Singh K, Carson K, Shah R, et al. Meta-analysis of clinical correlates of acute mortality in takotsubo cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2014; 113(8): 1420–1428, doi: [10.1016/j.amjcard.2014.01.419](https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2014.01.419), indexed in Pubmed: [24685327](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24685327/).
108. Shimabukuro-Vornhagen A, Gödel P, Subklewe M, et al. Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer.* 2018; 6(1): 56, doi: [10.1186/s40425-018-0343-9](https://doi.org/10.1186/s40425-018-0343-9), indexed in Pubmed: [29907163](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29907163/).
109. Ali SA, Shi V, Maric I, et al. T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood.* 2016; 128(13): 1688–1700, doi: [10.1182/blood-2016-04-711903](https://doi.org/10.1182/blood-2016-04-711903), indexed in Pubmed: [27412889](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27412889/).
110. Locke FL, Neelapu SS, Bartlett NL, et al. Phase 1 results of ZUMA-1: a multicenter study of KTE-C19 anti-CD19 CAR T cell therapy in refractory aggressive lymphoma. *Mol Ther.* 2017; 25(1): 285–295, doi: [10.1016/j.ymthe.2016.10.020](https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.10.020), indexed in Pubmed: [28129122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28129122/).
111. Brudno JN, Maric I, Hartman SD, et al. T cells genetically modified to express an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of poor-prognosis relapsed multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2018; 36(22): 2267–2280, doi: [10.1200/JCO.2018.77.8084](https://doi.org/10.1200/JCO.2018.77.8084), indexed in Pubmed: [29812997](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29812997/).
112. Venkiteshwaran A. Tocilizumab. *MAbs.* 2009; 1(5): 432–438, doi: [10.4161/mabs.1.5.9497](https://doi.org/10.4161/mabs.1.5.9497), indexed in Pubmed: [20065633](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20065633/).
113. Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy — assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018; 15(1): 47–62, doi: [10.1038/nrclinonc.2017.148](https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.148), indexed in Pubmed: [28925994](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28925994/).
114. Nellan A, McCully CM, Cruz Garcia R, et al. Improved CNS exposure to tocilizumab after cerebrospinal fluid compared to intravenous administration in rhesus macaques. *Blood.* 2018; 132(6): 662–666, doi: [10.1182/blood-2018-05-846428](https://doi.org/10.1182/blood-2018-05-846428), indexed in Pubmed: [29954750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29954750/).