

PRACA POGLĄDOWA/REVIEW PAPER

Terapia CAR-T w onkologii i w innych dziedzinach medycyny

CAR-T therapy in oncology and other fields of medicine

Amelia Kieraszińska¹, Damian Ciunowicz², Marta Węgierska¹, Ewelina Stoczyńska-Fidelus², Piotr Rieske¹

¹Zakład Biologii Nowotworów, Katedra Biologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

²Zakład Biologii Molekularnej, Katedra Biologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

STRESZCZENIE

Ostatnio dokonuje się przełom w immunoterapiach. Rozwój produktów leczniczych terapii zaawansowanej (*advanced therapy medicinal product* – ATMP) jest tego dobitnym przykładem. Terapia CAR-T (*chimeric antigen receptors T cell therapy*) jest efektem współpracy biotechnologów, onkologów i immunologów. W artykule poruszono problematykę związaną z rozwojem technologii CAR-T. Omówiono podstawy projektowania CAR-T i mechanizm działania tej terapii. Przedstawiono generalne zasady tworzenia kolejnych generacji CAR-T. Wskazano sukcesy terapii opartej na CAR-T, związane głównie z leczeniem pacjentów z białaczkami i chłoniakami. Opiszono główne cele molekularne CAR-T, takie jak CD19 czy CD22. Jednocześnie zwrócono uwagę na dotychczasowe ograniczenia dotyczące terapii pacjentów z guzami litymi. Opiszono przykładowy cel dla terapii guzów litych, za jaki uznaje się zmutowany receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu EGFRvIII. Wskazano jednak, na jakie trudności natrafia terapia przeciwko komórkom EGFRvIII-pozytywnym. Przedstawiono również rosnące znaczenie PSMA i GD2 jako celów dla CAR-T. Opiszono nowe trendy w obrębie tej technologii, takie jak CAR-M. Scharakteryzowano potencjalne zastosowane CAR-T w chorobach nienowotworowych, w tym alergiach lub chorobach zakaźnych z włączeniem COVID-19.

SŁOWA KLUCZOWE

CAR-T, białaczka, chłoniak, guzy lite, EGFRvIII, alergia, astma, zwłóknienie serca, COVID-19, choroby zakaźne.

ABSTRACT

Recently, there has been a breakthrough in immunotherapy. The development of the advanced therapy medicinal product (ATMP) is a striking example of that. Chimeric antigen receptors T cell therapy (CAR-T therapy) is the result of cooperation between biotechnologists, oncologists and immunologists. This article deals with the issues related to the development of CAR-T technology. The basics of CAR-T design and the mechanism of this therapy action are discussed. Its successes were indicated mainly in the treatment of patients with leukemias and lymphomas. EGFRvIII as an exemplary target for the therapy of solid tumors is described. However, it was pointed out what difficulties the therapy against mutated variant of epidermal growth factor receptor EGFRvIII-positive cells encounters. The growing importance of PSMA and GD2 as targets for CAR-T was also pointed out. New trends in this technology, such as the next generations of CAR-T and development of

CAR-M, were noticed. Finally, the potential of CAR-T treatment in non-cancerous diseases, such as cardiac diseases, allergies or infectious diseases, including COVID-19, was characterized.

KEY WORDS

CAR-T, leukemia, lymphoma, solid tumors, EGFRvIII, allergy, asthma, cardiac fibrosis, COVID-19, infectious diseases.

ADRES DO KORESPONDENCJI

Ewelina Stoczyńska-Fidelus, Zakład Biologii Molekularnej, Katedra Biologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Żeligowskiego 7/9, 90-752 Łódź, Polska, ewelina.stoczynska-fidelus@umed.lodz.pl

WSTĘP

CAR-T (*chimeric antigen receptors T cell therapy*) to immunoterapia należąca do ATMP (*advanced therapy medicinal products*; produkty lecznicze terapii zaawansowanej). Dotychczas jest wykorzystywana w onkologii, ale np. tzw. CAR-T senolityczne mogą znaleźć zastosowanie w diabetologii lub nawet alergologii [1, 2]. Technologia CAR-T, w której litera C pochodzi od słowa chimera, to połączenie dwóch rodzajów odpowiedzi swoistej układu odpornościowego – cytotoksycznej (limfocyty T) i humoralnej (przeciwciała) [3]. Połączenie występuje w sensie dosłownym – fragment zmienny przeciwciała jest połączony kowalencyjnie z częścią podbłonową TCR i białek uczestniczących w transdukcji sygnałów z TCR [4]. Kolejne generacje CAR-T zawierają coraz więcej elementów ze szlaku transdukcji TCR. To chimerowe białko jest kodowane przez sztucznie wytworzony transgen [5]. Biotechnolodzy, współpracując z immunologami i inspirowani cytotoksycznością zależną od przeciwciała, stworzyli chimery: część zmienna przeciwciała wraz z częścią receptora komórki cytotoksycznej i białkami transdukcji sygnału z TCR [6]. Zamysłem było uzyskanie przewagi w walce z nowotworami w stosunku do naturalnych rodzajów odpowiedzi swoistej. Przeciwciała nie docierają do wszystkich fragmentów nowotworu, bo jego utkanie ten proces utrudnia, ale komórki z fragmentami przeciwciała zakotwiczone w błonie komórkowej dzięki połączeniu z elementami receptora TCR i białkami, przez które transdukuje on sygnał, umieją dotrzeć wszędzie i zabić komórki nowotworowe [7, 8]. Klasyczne limfocyty nie zawsze mogą rozpoznać antygeny nowotworowe prezentowane na molekułach MHC, bo komórki nowotworowe na różne sposoby zapobiegają temu procesowi lub niwelują jego konsekwencje [9]. Przeciwciała, a raczej ich fragmenty zmienne zakotwiczone w błonie komórek (CAR-T), rozpoznają struktury charakterystyczne dla komórek nowotworowych i nie potrzebują molekuł

MHC [10]. Należy jednak wybrać na cel dla CAR-T (dla części zmiennej przeciwciała) te białka (antygeny), których komórki nowotworowe nie mogą ukryć czy tym bardziej zaniechać ich produkcji. Muszą być one bardzo potrzebne do funkcjonowania komórek nowotworowych [11]. Struktury te rozpoznawane są za pośrednictwem części zmiennej przeciwciała przez komórki cytotoksyczne CAR-T. Po takim rozpoznaniu CAR-T niszczy komórki nowotworowe, podobnie jak limfocyty T cytotoksyczne niszczy komórki prezentujące za pomocą MHC klasy I obce antygeny [12]. Inspiracją do tworzenia takiej technologii były, jak wspomniano, analizy tzw. ADCC cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciała. Ponadto w tej chwili próbuje się modyfikować również limfocyty, aby wytwarzać komórki korzystające z podobnych receptorów Fc, posługując się mechanizmem bardziej zbliżonym do ADCC. Chodzi w tym przypadku o to, aby tworzyć transgeny, które będą kodowały chimerowe białko immunoglobulina i receptor Fc w obrębie limfocytów T [5, 6, 13]. Również w tym przypadku możliwe jest rozbudowanie białka chimerowego o molekuły ze szlaków transdukcji sygnałów [14]. Kluczowe jest to, że takie pochodne limfocytów, które mają przeciwciała (w CAR-T ich fragmenty), połączone są z receptorami na stałe (nieodwracalnie kowalencyjnie), a nie tak jak w mechanizmie ADCC w sposób odwracalny [12]. Komórki nowotworowe wymykają się każdej z dwóch istniejących oddzielnie w naturze i działających w sposób niezależny swoistych odpowiedzi naszego układu odpornościowego (humoralnej i komórkowej). CAR-T, łącząca dwa sposoby odpowiedzi, to broń, z którą komórki nowotworowe wcześniej się nie zetknęły. W ostatnim czasie próbuje się również tworzyć chimerowe makrofagi (CAR-M) [15]. CAR-T mają też oczywiście ograniczenia. Przykładowo pacjent czeka wiele tygodni na wyprodukowanie jego własnych CAR-T, aby przeszczep był autologiczny. Obecnie trwa wyścig do stworzenia uniwersalnych CAR-T – gotowych dla każdego pacjenta z określonym

typem nowotworu. Nazywa się je *CAR-T off the shelf* – „CAR-T czekające na półce” [16].

Już teraz jednak dzięki CAR-T otrzymywanym indywidualnie dla chorego udaje się wyleczyć niektóre białaczki czy chłoniaki [17]. CAR-T w terapii tzw. guzów litych, czyli raków, mięsaków, guzów mózgu, stanowi trudniejsze wyzwanie [18]. Wykorzystanie CAR-T w alergologii lub chorobach z dysregulacją układu odpornościowego to kolejna trudniejsza część badań nad CAR-T [2, 19].

MECHANIZM DZIAŁANIA TERAPII CAR-T

Mechanizm działania immunoterapii CAR-T jest wyjątkowo interesujący. Terapia ta bazuje na własnych limfocytach T pacjenta onkologicznego. Komórki T zostają genetycznie zmodyfikowane, aby mogły rozpoznawać i eliminować komórki nowotworowe z organizmu. Ponadto usuwanie komórek nowotworu następuje bez wcześniejszego prezentowania antygenów limfocytom T za pośrednictwem białek głównego układu zgodności tkankowej (*major histocompatibility complex* – MHC) [10, 20].

Początkowy etap immunoterapii CAR-T polega na pobraniu krwi obwodowej pacjenta oraz wyizolowaniu z niej leukocytów (w tym limfocytów T) w procesie nazywanym leukaferazą [21]. Pozyskane w ten sposób limfocyty T są następnie poddawane modyfikacji genetycznej. Najczęściej w procesie transdukcji za pośrednictwem wirusowego wektora do komórek T wprowadzany jest chimeryczny receptor antygenowy (*chimeric antigen receptor* – CAR), odpowiedzialny za wiązanie specyficznego antygeny na powierzchni komórek nowotworowych. Limfocyt taki ma zdolność eliminacji komórek, na których powierzchni występuje antygen, przeciwko któremu w obrębie CAR występuje część zmienna przeciwciała [20].

Obecnie wyróżnia się trzy generacje CAR. Chimeryczny receptor antygenowy pierwszej generacji jest białkiem fuzyjnym złożonym z wewnątrzkomórkowej domeny sygnałowej zawierającej CD3 ζ , domeny transbłonowej oraz zewnątrzkomórkowej domeny zawierającej jednołańcuchowy zmienny fragment (*single-chain variable fragment* – scFv) przeciwciała wiążący odpowiednie białko w błonie komórek nowotworu. CAR drugiej generacji ma dodatkowo cząsteczkę kostymulującą, tj. CD28, CD137, CD134, 4-1BB lub OX-40, związaną z CD3 ζ . W CAR trzeciej generacji fragment sygnałowy związany jest z dwiema odrębnymi domenami kostymulującymi [4, 5, 22].

Z pozoru pozyskiwanie limfocytów CAR-T wiążących i usuwających komórki guza z organizmu pacjenta cierpiącego na chorobę nowotworową wydaje się nieskomplikowane. W praktyce jednak proces ten jest nieco bardziej złożony. Pierwotnie konieczne jest otrzymanie wektora retro- lub lentiwirusowego przenoszącego odpowiedni CAR. W tym celu zakłada się hodowle linii komórkowej

o szczególnej skłonności do transfekcji, takie jak linia komórek eukariotycznych HEK-293T, lub analogicznej. Cząsteczki wektora wirusowego generowane są w warunkach *in vitro* poprzez przejściową transfekcję wskazanej linii komórkowej plazmidami zawierającymi sekwencje poszczególnych genów struktury retro- lub lentiwirusa oraz elementów CAR. Otrzymane wektory wirusowe przenoszące CAR dodawane są następnie do hodowli aktywowanych komórek T pacjenta. W procesie transdukcji do limfocytów T wprowadzany jest CAR, który na koniec pojawi się w błonie limfocytów i docelowo będzie odpowiadać za rozpoznawanie oraz wiązanie antygenów na powierzchni komórek guza [23]. Zmodyfikowane komórki CAR-T są namnażane *ex vivo* do odpowiedniej liczby, zdolnej do usuwania komórek nowotworowych z organizmu chorego. W tym czasie pacjent otrzymuje chemioterapię limfodeplecyjną (*lymphodepleting chemotherapy*), składającą się z fludarabiny i cyklofosfamidu, w celu ograniczenia liczby komórek T w jego krwi obwodowej. W końcowej fazie limfocyty CAR-T są ponownie podawane pacjentowi podczas jednokrotnej infuzji dożyłnej [24]. W organizmie chorego zmodyfikowane limfocyty powinny proliferować, przez co nierzadko nazywa się je tzw. żywym lekiem [25].

Immunoterapia CAR-T okazuje się niezwykle obiecującą i skuteczną metodą w leczeniu pacjentów z nowotworami hematologicznymi za pomocą ich własnych komórek układu odpornościowego. Ponadto pojawiają się również doniesienia o potencjalnej możliwości walki z guzami litymi za pośrednictwem zmodyfikowanych limfocytów CAR-T pacjentów onkologicznych [26].

CAR-T W BIAŁACZKACH I CHŁONIAKACH

Wysoka specyficzność terapii z wykorzystaniem komórek CAR-T stworzyła nowe możliwości w walce z wieloma nowotworami, ponieważ dzięki nim można skierować leczenie bezpośrednio przeciw komórkom nowotworowym, nie szkodząc komórkom prawidłowym [27].

Obecnie największą efektywność komórek CAR-T obserwuje się u pacjentów z nowotworami hematologicznymi [17].

Amerykańska Agencja Żywności i Leków wyraziła zgodę na wykorzystanie technologii CAR-T między innymi u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną (*acute lymphoblastic leukemia* – ALL) oraz pacjentów z nawrotnym i opornym na leczenie chłoniakiem nieziarniczym wywodzącym się z limfocytów B (*non-Hodgkin's lymphoma* – NHL). W przypadku pierwszej grupy dopuszczony preparat nosi nazwę Kymriah i został on również zaakceptowany do użytku u pacjentów z grupy drugiej. Yescarta to nazwa drugiego dopuszczonego preparatu i znalazł on zastosowanie u dorosłych pacjentów z NHL.

Użycie obu preparatów zostało zatwierdzone tylko na terenie Stanów Zjednoczonych [28–30].

Komórki CAR-T stosowane w przypadku obu tych nowotworów wyposażone są w receptory wiążące glikoproteinę CD19, będącą białkiem charakterystycznym zarówno dla dojrzewających, jak i już dojrzałych limfocytów B [31, 32]. W przypadku obu wspomnianych wyżej nowotworów obserwuje się nadmierną proliferację limfocytów B i/lub ich dysfunkcję, dlatego też to właśnie one są celem podczas terapii z wykorzystaniem komórek CAR-T [33, 34].

Należy jednak wziąć pod uwagę, że dostępnych jest aktualnie wiele metod leczenia nowotworów hematologicznych, takich jak chemioterapia, radioterapia oraz przeszczep krwiotwórczych komórek macierzystych, które pozwalają uzyskać zadowalające efekty terapeutyczne [35, 36].

Wciąż jednak istnieje odsetek pacjentów, u których pojawiają się nawroty choroby, charakteryzujące się opornością na dotychczas stosowane leczenie [37–39].

Nadzieją na wyleczenie tych właśnie pacjentów jest przeprowadzenie wspomnianej wyżej transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych wymagającej wystąpienia remisji oraz odpowiedniego dawcy, a także nowoczesne terapie z wykorzystaniem komórek CAR-T [17, 40].

Wyniki dotychczasowych badań pokazują, że komórki CAR-T wyposażone w receptor wiążący antygen CD19 pozwalają na uzyskanie kompletnej remisji nowotworu u blisko 90% pacjentów z nawrotową, oporną na leczenie ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL), podczas gdy wartość ta nie przekracza 45% dla klasycznej chemioterapii [41].

W przypadku nawrotowej, odpornej na leczenie przewlekłej białaczki limfocytowej (CLL) pozytywny wynik terapii zaobserwowano aż u 57% pacjentów, wśród których doszło do częściowej lub kompletnej remisji nowotworu [42].

W lutym 2021 roku FDA wyraziła zgodę na zastosowanie komórek CAR-T skierowanych przeciwko antygenowi CD19 u dorosłych pacjentów z nawrotowym i opornym na leczenie chłoniakiem nieziarniczym pochodzącym z limfocytów B (*Hodgkin's lymphoma* – HL), gdy pierwsza i/lub druga linia terapii nie przyniosła efektów. Dotychczasowe badania pokazują, że efektywność terapii bazującej na komórkach CAR-T sięga ponad 50% [29].

Innym nowotworem hematologicznym wywodzącym się z limfocytów B jest chłoniak Hodgkina. U pacjentów z nawrotową i oporną na leczenie formą tego chłoniaka przeprowadzane są aktualnie badania kliniczne wykorzystujące komórki CAR-T rozpoznające antygen CD30, którego nadekspresja jest charakterystyczna dla komórek chłoniaka Hodgkina. Wyniki I i II fazy badań klinicznych pokazują, że u 59% pacjentów zaobserwowano całkowitą

remisję nowotworu, a aż 94% pacjentów przeżyło co najmniej rok od zastosowania terapii [43].

Ponieważ zaprojektowanie odpowiednich komórek CAR-T wymaga znajomości antygenów specyficznych dla danych typów komórek, naukowcy nadal poszukują idealnych celów terapeutycznych np. dla szpiczaka mnogiego (*multiple myeloma* – MM). Wydawałoby się, że komórki szpiczaka mnogiego, wywodzące się również z limfocytów B, będą podatne na leczenie komórkami CAR-T skierowanymi przeciwko antygenowi CD19. Jednak w przypadku tego nowotworu praktycznie nie dochodzi do ekspresji glikoproteiny CD19, a dotychczasowe badania pokazały, że komórki CAR-T z receptorem przeciwko antygenowi CD19 dają praktycznie nikłe efekty [44]. Antygen specyficzny dla dojrzewających limfocytów B (*B cell maturation antigen* – BCMA) wydaje się obiecującym celem terapeutycznym w walce ze szpiczakiem mnogim. Aktualnie przeprowadzane badania kliniczne przedstawiają, że pozytywny efekt terapeutyczny uzyskano u 20–64% pacjentów z nawrotową i oporną na leczenie formą szpiczaka mnogiego po zastosowaniu komórek CAR-T specyficznych dla BCMA [45].

W przypadku pozostałych nowotworów hematologicznych, takich jak ostra białaczka szpikowa (*acute myeloid leukemia* – AML) czy inne chłoniaki nieziarnicze, nadal poszukuje się idealnych celów terapeutycznych oraz próbuje się zastosowania dostępnych już komórek CAR-T (np. anty-CD19) w połączeniu z klasyczną chemioterapią [46, 47].

Niestety pomimo wielu zalet wykorzystanie komórek CAR-T u pacjentów z nowotworami hematologicznymi wiąże się również z występowaniem poważnych skutków ubocznych. Do najczęstszych należy zespół uwalniania cytokin (*cytokine release syndrome* – CRS) oraz prawdopodobnie wynikająca z niego wysoka neurotoksyczność. Zespół uwalniania cytokin wiąże się z szybkim namnażaniem się modyfikowanych limfocytów T wprowadzonych do krwiobiegu pacjenta i gwałtownym uwolnieniem cytokin [48].

Możliwe jest, że nagły wzrost stężenia cytokin prozapalnych w krwiobiegu i płynie mózgowo-rdzeniowym prowadzi do uszkodzenia bariery krew–mózg. Neurotoksyczność obserwowana u pacjentów poddanych terapii komórkami CAR-T objawia się m.in. bólami głowy, zaburzeniami mowy, halucynacjami wzrokowymi [49].

W przypadku komórek CAR-T warto również zwrócić uwagę na to, że antygeny, przeciwko którym skierowane są modyfikowane limfocyty T, mogą pojawiać się nie tylko na komórkach nowotworowych, lecz także w pewnym stopniu na komórkach prawidłowych. Fakt ten niesie ze sobą ryzyko występowania niespecyficzności terapii i może skutkować uszkodzeniem prawidłowych tkanek [50]. Dlatego też tak ważne jest, by precyzyjnie dobrać

antygen, który ma być rozpoznawany przez komórki CAR-T [11].

Wykorzystanie komórek CAR-T w onkologii niesie ogromne nadzieje terapeutyczne, zwłaszcza dla pacjentów z nowotworami hematologicznymi. Już dziś dzięki wielu aktualnie prowadzonym badaniom klinicznym obserwuje się wysoką skuteczność terapii z zastosowaniem modyfikowanych limfocytów T. Pozostaje jedynie kwestia eliminacji poważnych skutków ubocznych związanych z gwałtownym uwalnianiem cytokin prozapalnych, które mogą negatywnie wpłynąć na efektywność terapii [51].

GLÓWNE MECHANIZMY NIEPOWODZENIA TERAPII ADOPTYWNEJ LIMFOCYTAMI CAR-T

Na podstawie dotychczas opublikowanych danych z badań klinicznych oraz oceny skuteczności CAR-T w białaczkach i chłoniakach nieziarnicznych cel, jaki należy wyznaczyć w dalszej pracy nad rozwojem terapii CAR-T, to optymalizacja podejścia oparta przede wszystkim na przezwyciężeniu głównych problemów związanych ze skutecznością terapii CAR-T u niektórych pacjentów. Wraz z rozpowszechnieniem stosowania terapii adoptywnej limfocytami CAR-T naukowcy dostrzegają problemy związane z opornością i nawrotami. Pomimo niezwykle obiecujących wyników, jak również pozytywnej odpowiedzi na terapię także u pacjentów z opornymi, nawracającymi nowotworami, nadal pozostaje pewna grupa chorych, u których nie obserwuje się odpowiedzi na zastosowaną terapię [52]. Wyniki badań klinicznych wskazują również, że u części pacjentów dochodzi do nawrotu choroby, po wcześniejszej pozytywnej odpowiedzi na podanie komórek CAR-T [53]. Terapia CAR-T często skutecznie wywołuje czasową remisję, jednak uniknięcie nawrotu choroby stanowi u wielu pacjentów wyzwanie.

Do nawrotu choroby najczęściej może dochodzić z powodu utraty antygeny na komórce nowotworowej (7–33% chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną) [54, 55]. Jako mechanizm utraty antygeny wskazuje się obecnie kilka zjawisk. Jednym z nich jest alternatywny splicing, w wyniku którego dochodzi do powstawania takich wariantów antygenów, które nie zawierają epitopu wcześniej rozpoznawanego przez komórkę CAR-T [56]. Innym zbadanym i niezwykle ciekawym zjawiskiem jest tzw. *cell lineage switch*, gdy po zastosowaniu terapii CAR-T anty-CD19 u pacjentów z ALL CD19+ następuje nawrót choroby w postaci ostrej białaczki szpikowej (AML CD19–) wraz z obserwowaną zmianą fenotypu białaczkowego z limfoidalnego na szpikowy [57]. Kolejnym z często występujących zjawisk odpowiedzialnych za brak skuteczności CAR-T jest obniżenie ekspresji antygeny w takim stopniu, który uniemożliwia zainicjowanie funkcji litycznej przez limfocyt CAR-T. Mackall i wsp. wykazali, że niska

ekspresja CD30 na hematopoetycznych komórkach progenitorowych (HPC) jest niewystarczająca, aby wywołać cytolizę, w przeciwieństwie do wysokiej ekspresji, obecnej w komórkach chłoniaka. Co interesujące, działanie CAR-T jest regulowane nie tylko przez gęstość antygeny na docelowych komórkach nowotworowych, lecz także przez samą gęstość CAR na zmodyfikowanych limfocytach T [58]. Ten sam zespół udokumentował także, że nawroty obserwowane u pacjentów leczonych CAR-T anty-CD22 bezpośrednio korelują ze zmniejszonym poziomem CD22 na komórkach B-ALL [59]. Badacze posunęli się dalej, aby wykazać w badaniach na zwierzętach, że różne poziomy CD22 na komórkach białaczkowych mogą mieć krytyczny wpływ na skuteczność przeciwnowotworową. Wyniki te mają implikacje nie tylko dla stosowania terapii CAR-T w nowotworach hematologicznych, lecz także w związku z dużym postępem w zakresie możliwości wykorzystania komórek CAR-T w guzach litych.

Wyniki badań klinicznych wskazują, że zjawisko utraty antygeny CD19 to główne niepowodzenie w terapii (nawet do 60% nawrotów białaczek po terapii komórkami CAR-T anty-CD19) [60]. Podkreśla to potrzebę zastosowania innego systemu łączącego różne cele terapeutyczne. Obecnie optymalnym rozwiązaniem przeciwdziałającym nawrotom w wyniku utraty antygeny komórki nowotworowej są terapie wykorzystujące CAR-T skierowane przeciw więcej niż jednemu antygenowi. Takie podejście osiągnięte jest albo poprzez jednoczesne lub sekwencyjne podawanie różnych komórek CAR-T skierowanych przeciw różnym antygenom (koadministracja) lub też skonstruowanie bispecyficznych lub tandemowych CAR-T (jedna komórka T ma dwie lub więcej cząsteczki CAR skierowane przeciw różnym antygenom) [61]. Możliwa jest również kotransdukcja, czyli transdukcowanie komórek T dwoma wektorami kodującymi różne CAR, w wyniku czego otrzymuje się komórki pozytywne dla jednego pojedynczego CAR (antygen 1), komórki pozytywne dla drugiego pojedynczego CAR (antygen 2) oraz pozytywne dla obu CAR.

Za podejściem w terapii CAR-T do celowania w więcej niż jeden antygen przemawia dużo zalet, niemniej pozostaje wiele krytycznych zagadnień, takich jak ocena bezpieczeństwa zastosowania, szczególnie pod kątem zwiększenia toksyczności, które wymagają dalszych badań. Wiedza na temat profilu bezpieczeństwa i aktywności *in vivo* komórek CAR-T ukierunkowanych na więcej niż jeden antygen jest niepełna. Możliwe jest, że celowanie w więcej niż jeden antygen może prowadzić do bardziej rozległego efektu cytotoksycznego związanego z uwalnianiem cytokin, tzw. burzy cytokinowej. Nie jest również jasne, czy aktywność cytotoksyczna obserwowana *in vivo* jest spowodowana preferencyjnym wyborem jednego antygeny ponad inny oraz czy w warunkach

kach, w których podawany jest więcej niż jeden produkt CAR-T (koadministracja), nastąpi równomierna dystribucja zmodyfikowanych komórek [62]. Do oceny skuteczności podejść opartych na zastosowaniu CAR-T przeciw dwóm antygenom konieczne będą długoterminowe obserwacje. Obecnie realizowanych jest już wiele badań klinicznych pod tym kątem, ale trwałość remisji po takiej terapii jest krytycznym pytaniem bez odpowiedzi z uwagi na wczesne fazy realizacji tych badań [61]. We wczesnych fazach badania pokazują bezpieczeństwo i techniczną wykonalność podwójnego CAR-T. Zaobserwowano niską toksyczność z zależnym od dawki wysokim odsetkiem całkowitej odpowiedzi (*complete response* – CR) [63]. W badaniach przedklinicznych CAR-T z konstruktem tandemowym skutecznie wyeliminowało komórki linii komórkowej Raji zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [64]. W modelu zwierzęcym limfocyty CAR-T z układem tandemowym zapewniały lepszą skuteczność przeciw komórkom białaczkowym w porównaniu z odpowiedzią indukowaną przez pojedyncze komórki anty-CD19 lub anty-CD20 CAR-T lub ich mieszaninę [65], a wyniki z fazy przedklinicznej zostały przełożone na I fazę badań klinicznych – pierwsze ludzkie bispecyficzne CAR-T z tandemowym receptorem anty-CD19/anty-CD20 [66]. Wczesne wyniki tego badania wykazały CR lub odpowiedź częściową (*partial response* – PR) u 3 z 6 wstępnie leczonych pacjentów z nawracającą NHL komórek B (terapia komórkami CAR-20.19-T). U 3 pacjentów, u których nastąpił postęp lub nawrót choroby, stwierdzono obecność CD19 lub CD20 podczas kolejnej biopsji, co sugerowałoby jednak mechanizmy inne niż utrata antygeny jako etiologię niepowodzenia terapii.

Drugim z najczęściej wymienianych mechanizmów odpowiedzialnych za nieskuteczność terapii CAR-T jest tzw. wyczerpanie limfocytów T. Pojęcie „wyczerpania” (*T-cells exhaustion*) odnosi się do stanu dysfunkcji charakteryzującego się ograniczeniem funkcji efektorowej w postaci utraty funkcji cytotoksycznych i szczególnie zwiększoną ekspresją receptorów hamujących odpowiedź immunologiczną, tzw. immunologicznych punktów kontrolnych. Wyczerpanie po przewlekłej ekspozycji na antygen zwykle wywołane jest przez przewlekłą stymulację, np. w nowotworach [67]. Cechą charakterystyczną takich „wyczerpanych” limfocytów jest ich upośledzona zdolność do proliferacji po zetknięciu się z antygenem. Schuster i wsp. wykazali, że w DLBCL wysoki odsetek limfocytów T LAG3+, biomarkera wyczerpania limfocytów T, jest skorelowany z ograniczoną odpowiedzią na terapię limfocytami CAR-T anty-CD19 [68].

Wśród mechanizmów odpowiedzialnych za (lub ogólniej ujmując – związanych z) ograniczoną proliferację zmodyfikowanych limfocytów CAR-T wymienia się aktywację komórkowego starzenia się (senescencji) [69–

72]. Nie wiadomo natomiast obecnie, czy wyczerpanie limfocytów wynika bezpośrednio z senescencji, czy też są jednocześnie obserwowane niezależne zjawiska, na co mogłaby wskazywać np. odmienna ekspresja określonych receptorów. Przykładowo senescentne limfocyty T charakteryzują się niską ekspresją CD28 i wysoką receptorów NK, podczas gdy limfocyty o cechach wyczerpania mają zwiększoną ekspresję PD-1 i CTLA-4 [73].

Mechanizmy wyczerpania komórek CAR-T nie są dobrze poznane. Jedno z badań sugerowało, że receptory CAR na limfocytach T mogą się spontanicznie gromadzić, niezależnie od antygeny, generując toniczną sygnalizację CAR-CD3 ζ , która z kolei może indukować wyczerpanie limfocytów CAR-T [74]. Innym mechanizmem odpowiedzialnym za indukcję wyczerpania w limfocytach CAR-T może być endogeny sygnał TCR w obecności specyficznego antygeny [75].

Niezwykle istotne pod tym względem są prace dotyczące szczególnie CAR-T czwartej generacji i roli znaczenia receptora programowanej śmierci 1 oraz jego ligandów (PD-1 i PD-L1). CAR-T czwartej generacji mogą zawierać regiony kodujące inhibitory punktów kontrolnych układu odpornościowego (np. anty-PD1, anty-CTLA-4 lub anty-PD-L1). CAR-T wydzielające te inhibitory zapobiegają wyczerpaniu komórek T, kilkukrotnie zmniejszają wzrost i masę guza w przypadku nowotworów litych w porównaniu z działaniem *parental* CAR-T, zwiększają poziom wydzielanego granzymu B. Podsumowując – zwiększają one aktywność przeciwnowotworową komórek CAR-T i zwiększają ich przeżywalność *in vivo* [76]. Wśród podejść do zahamowania aktywności PD-1 rozpatruje się terapię CAR-T skojarzoną z przeciwciałami przeciw PD-1 (np. niwolumab) lub innymi działającymi na tej samej zasadzie inhibitorami PD-1 i PD-L1, np. ipilimumab (bloker CTLA-4, PD-L1), pembrolizumab, atezolizumab, awelumab, durwalumab, cemiplimab, spartalizumab [77]. Alternatywnym podejściem jest zastosowanie wewnętrznej blokady (*intrinsic blockade*) polegającej na modyfikacji uzyskanych komórek CAR-T w taki sposób, by wyciszyć ekspresję PD-1, np. przy użyciu systemu CRISPR/Cas9 [78]. Niemniej najnowsze doniesienia wskazują, że całkowite zablokowanie ekspresji PD-1 również może negatywnie wpływać na potencjał przeciwnowotworowy komórek CAR-T, hamując aktywność proliferacyjną komórek T i przyspieszając wczesne różnicowanie komórek T [79, 80]. Co ciekawe, lokalna blokada PD-1 (w komórkach nowotworowych) może zwiększyć aktywność przeciwnowotworową komórek CAR-T, unikając jednocześnie toksyczności związanej z ogólnoustrojową blokadą PD-1 [81].

Aktualnie najgroźniejszym działaniem niepożądanym terapii CAR-T jest zespół uwalniania cytokin (*cytokine release syndrome* – CRS), który w różnym stopniu nasilenia

wystąpił u prawie wszystkich pacjentów po zastosowaniu produktu Yescarta. Możliwe jest ponadto, że celowanie w więcej niż jeden antygen może prowadzić do bardziej rozległego efektu cytotoksycznego związanego z uwalnianiem cytokin, co uniemożliwi podawanie takich CAR-T, pomimo że ich skuteczność byłaby większa. Ostatnio wykazano istotny, precyzyjny wpływ na regulację toksyczności podobnej do zespołu uwalniania cytokin po zastosowaniu limfocytów CAR-T przy użyciu adapterów o niskiej masie cząsteczkowej [82]. Strategia ta oparta jest na dostosowywaniu dawki niskocząsteczkowego adaptera, który by zapoczątkować eradykację guza, musi połączyć CAR-T na limfocycie z antygenem na komórce nowotworowej. Alternatywnym podejściem do kontrolowanej aktywności i zwiększonego bezpieczeństwa klinicznego w zakresie ograniczenia możliwości wystąpienia CRS jest opracowanie indukowanych komórek T według modelu regulacji ekspresji genów przez antybiotyki z grupy tetracyklin, tzw. system Tet-On/Tet-Off, w którym ekspresja transgenu zależy od doksycykliny [83–86]. Stwierdzono jednak, że zastosowanie w sekwencji kodującej CAR systemów regulacyjnych opartych na rozwiązaniach znanych z systemów prokariotycznych lub wirusowych może zwiększać immunogenność transgenu [83].

WYZWANIA I STRATEGIE W STOSOWANIU ADOPTYWNEJ IMMUNOTERAPII CAR-T W GUZACH LITYCH

Rozwój technologii wykorzystujących zmodyfikowane limfocyty T następuje bardzo szybko. Taka intensywność prowadzonych badań daje możliwości terapeutyczne, jakich nie dawały w pewnych rodzajach nowotworów chemio- czy radioterapia. Nie ma wątpliwości, że immunoterapia adopcyjna limfocytami CAR-T to przełomowe i wysoce efektywne narzędzie do walki z nowotworami krwi. Jednocześnie podejście to jest coraz częściej rozpatrywane i badane w przypadku występowania guzów litych. Niemniej należy zauważyć, że doświadczenia kliniczne z terapią komórkami CAR-T w guzach litych i guzach mózgu są mniej zachęcające, ponieważ obecnie tylko kilku pacjentów uzyskało pełną odpowiedź na terapię [26].

To co należy zaznaczyć, to fakt, że w przeciwieństwie do nowotworów pochodzenia hematologicznego, w przypadku guzów litych aktualnie nie ma zarejestrowanej terapii opartej na CAR-T. Realizowanych jest natomiast bardzo dużo badań przedklinicznych i klinicznych, w trakcie których zidentyfikowano wiele przeszkód w skutecznym wprowadzeniu takiej terapii do praktyki klinicznej, takich jak ograniczony zestaw unikalnych antygenów, w które można wycelować cząsteczki CAR; wysoka heterogenność komórek guza pod względem ekspresji antygenów;

ograniczona funkcja efektorowa i przeżycie komórek T, zanim dotrą one do miejsc zmienionych nowotworowo; niezdolność komórek T do skutecznego dotarcia do guza i przenikania przez fizyczne bariery i wyraźne immunosupresyjne mikrośrodowisko guza [26].

Do najczęściej rozważanych w terapii antygenów zewnątrzpowierzchniowych zalicza się antygen błonowy gruczołu krokowego (PSMA). W grudniu 2020 roku ogłoszono rozpoczęcie badania fazy IA z kandydatem na lek w przypadku guzów litych, uniwersalnym CAR-T (UniCAR) z funkcją *switch* dla pacjentów w późnych stadiach nawrotowych nowotworów litych wykazujących ekspresję antygeny błonowego gruczołu krokowego PSMA (UniCAR-T-PSMA) [87]. Innym, praktycznie jedynym dobrze poznanym neoantygenem powierzchniowym jest zmutowany receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFRvIII), charakteryzujący się brakiem rozległej części domeny zewnątrzkomórkowej. Pod tym względem EGFRvIII jawi się jako unikalny cel dla CAR-T, występujący na powierzchni komórek nowotworowych, szczególnie często w glejakach wielopostaciowych (20–30% *glioblastoma*, *IDH1 wild type*). Warto także wymienić GD2, glikoproteinę, której nadekspresja obserwowana jest w siatkówczaku, glejaku, guzach Ewinga i innych guzach litych, zarówno wieku dziecięcego, jak i u dorosłych pacjentów onkologicznych [88]. W przypadku antygenów niewystępujących bezpośrednio na powierzchni komórek guzów litych badania kliniczne prowadzone są nad zastosowaniem CAR-T przeciw HER2 [89–94], antygenowi karcynoebriornalnemu CEA [95–99], IL-13R czy IL13Ra [100–104].

W przeciwieństwie do nowotworów hematologicznych, w przypadku guzów litych zarówno przemieszczanie się limfocytów T w okolice guza, jak i naciekanie są często silnie ograniczone przez mikrośrodowisko immunosupresyjne [105]. Wydzielane przez komórki guza chemokiny, takie jak CXCL1, CXCL12 czy CXCL5, zapobiegają zarówno przemieszczaniu się komórek T w kierunku zmian nowotworowych, jak i ich infiltracji [106–108]. Jednym ze sposobów przezwyciężenia tych trudności jest modyfikacja limfocytów T polegająca na uzyskaniu na ich powierzchni ekspresji receptora określonych chemokin [106]. Guzy lite uwalniają bardzo wiele różnych cząsteczek w celu stłumienia układu odpornościowego i ochrony przed atakiem komórek T. Interleukina 12 jest cytokiną przeciwdziałającą immunosupresyjnemu środowisku nowotworu, silnie indukującą odpowiedź komórek wrodzonej i nabytej odporności. Skonstruowanie komórek CAR-T wytwarzających własną IL-12 może być bezpieczniejszym sposobem na pokonanie bariery hamujących działanie przeciwnowotworowe [109]. Opracowywane są także limfocyty CAR-T anti-CD19 lub anti-MUC16 wydzielające IL-18, które wydają się re-

gulować mikrośrodowisko zarówno nowotworów hematologicznych, jak i guzów litych oraz pomagają wzmocnić endogenne odpowiedzi przeciwnowotworowe komórek T [110]. Ponadto immunosupresyjne mikrośrodowisko guza charakteryzuje się m.in. dużą gęstością naczyń krwionośnych, rozległym przeciekaniem naczyniowym, słabą integralnością struktury tkankowej, a zmiany te z kolei skutkują niedotlenieniem, niskim pH czy właśnie większą liczbą cytokin pochodzących z guza [111–113].

U pacjentów z guzami litymi terapia CAR-T osiągnęła najbardziej satysfakcjonujące wyniki w przypadku glejaków [114–117]. Jednak nawet tu pozostaje do przezwyciężenia wiele problemów, takich jak utrata antygeny na przykładzie EGFRvIII [118]. Obecnie prowadzone są już badania przedkliniczne i kliniczne nad zastosowaniem w przypadku glejaka m.in. bispecyficznych CAR-T przeciw HER2 i L-13Rα2 [119].

EGFRvIII I CAR-T

Doskonałym celem dla CAR-T wydaje się EGFRvIII. Stwierdzono, że jest on bardzo potrzebny komórkom nowotworowym jako konstytutywnie aktywny receptor [120]. Ponadto jest to mutant EGFR, który ma charakterystyczny epitop. Epitop ten znajduje się w części nadbłonowej tego mutantu i udało się otrzymać przeciwciała rozpoznające go bardzo specyficznie [121, 122]. Niestety kolejne badania sugerują, że EGFRvIII może być mocno problematycznym celem dla CAR-T. Badania EGFRvIII trwają od wielu lat. Początkowo wydawało się, że jest to klasyczny onkogen, który jest aktywny pod nieobecność liganda (EGF, TGF-α). W tym przypadku sugerowano, że EGFRvIII dimeryzuje z łatwością i dochodzi do transdukcji sygnału [123]. Ponadto odkryto, że dimeryzacja ta jest kowalencyjna dzięki temu, że po mutacji każdy z monomerów ma wolną cysteinę [124]. Kolejne badania znacznie skomplikowały ten obraz. Część wyników sugeruje, że dochodzi nie do homodimeryzacji, ale heterodimeryzacji EGFRvIII z EGFR aktywowanym przez EGF [125]. Zauważono, że aktywność kinazy tyrozynowej EGFRvIII jest na tyle niska, że sugeruje się powolny wpływ na komórki polegający na ich stopniowym epigenetycznym reprogramowaniu [126]. Ponieważ EGFRvIII ma niską aktywność kinazy, poszukiwano nawet jego wpływu jako kofaktora dla czynników transkrypcyjnych działających w jądrze komórkowym. Wiadomo zresztą, że o podobne wpływy podejrzewa się również sam EGFR [127]. Inne badania wskazały, że EGFRvIII może nawet aktywować HGFR za pomocą platformy białek zależnych od FAK [128]. Wszystkie te badania wskazują jednak, że aktywność EGFRvIII jest ciągle enigmatyczna, a to może oznaczać również, że w niektórych komórkach iluzoryczna. Trudności w wykryciu wyraźnej funkcji EGFRvIII po-

wodują, że zaczynają pojawiać się wątpliwości na temat tego, czy jest to białko, które wpływa w sposób zdecydowany na biologię komórki nowotworowej na wszystkich etapach nowotworzenia [129]. Wątpliwości te potęguje to, że EGFRvIII ulega ekspresji tylko w niektórych komórkach nowotworu, który jako taki wykazuje jego ekspresję. Można dojść do wniosku, że rola EGFRvIII jest bardzo znikoma [130]. Z genetycznego punktu widzenia łatwo wytłumaczyć, dlaczego EGFRvIII jest obecny tylko w części komórek. EGFRvIII stwierdza się tylko w części komórek nowotworowych, ponieważ jego obecność wynika z amplifikacji ekstrachromosomalnej. Powoduje to, że amplikony takie ma tylko część komórek danego nowotworu [131]. W tej sytuacji pojawia się pytanie, co się stanie, jeśli CAR-T doprowadzi do eliminacji tych części komórek guza, które wykazują ekspresję EGFRvIII. Wraca w tym miejscu również kwestia tego, czy EGFRvIII jako białko ma silną aktywność biologiczną czy nie. Niski odsetek komórek z EGFRvIII i słaba aktywność tego receptora wydają się stanowić element spójny w hipotezie mówiącej, że jego rola jest znikoma i być może przejściowa, np. tylko na wczesnym etapie powstawania nowotworu [132]. Tymczasem warunkiem doboru celu dla CAR-T jest poważna rola tego antygeny i to, że komórki nowotworowe nie mogą funkcjonować pod jego nieobecność. Hipotetycznie EGFRvIII może występować na nowotworowych komórkach macierzystych [133]. Jeśli to prawda, to wtedy niski odsetek komórek EGFRvIII nie stanowi wady, ale nawet zaletę. Po terapii CAR-T dochodziłoby początkowo do zaniku tylko niewielkiego procentu komórek nowotworowych. Co jest korzystne, bo masywna liza w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (OUN) może być bardzo niebezpieczna. Następnie po eliminacji komórek macierzystych, w domyśle EGFRvIII-pozytywnych, dochodziłoby do stopniowego zaniku całego nowotworu [134]. Pojęcie nowotworowej komórki macierzystej ostatnio ewoluuje lub nawet jest uznawane za nieprzystające do realiów biologii nowotworów [135]. Dodatkowo jest ono komplikowane właśnie przez takie procesy, jak amplifikacja ekstrachromosomalna, ponieważ plastyczność genetyczna komórek wynikająca z tego typu amplifikacji jest znacznie zwiększona [136]. Można obserwować różną liczbę kopii jakiegoś genu w obrębie amplikonów, następnie różną liczbę amplikonów w komórce nowotworowej i co najważniejsze – różne zestawy amplikonów, z różnymi onkogenami w różnych komórkach [137]. Amplikony mogą być wytracane. Dzieje się tak chociażby dlatego, że ich rozdział w czasie mitozy nie jest regulowany tak jak chromosomów, ale losowy [138]. Prawdopodobnie mogą być również nawet nabywane przez komórki, które ich nie mają za pośrednictwem pęcherzyków komórkowych – „infekowanie amplikonami” [136]. Amplikony EGFRvIII faktycznie wpisują się w taki

scenariusz, jednak w porównaniu z wątpliwościami co do jego aktywności jako receptora jest to dość ryzykowna koncepcja [129]. Ponadto istnieją również przesłanki przeciwko tej hipotezie. Przykładowo wznowy glejaków wielopostaciowych, których zmiany pierwotne wykazywały ekspresję EGFRvIII, w około 30% nie mają tego mutanta [132]. Co gorsza w nowotworach innych niż glejaki odsetek komórek EGFRvIII-pozytywnych jest bardzo znikomy. Stanowi to przesłankę dla hipotezy, że EGFRvIII jest ważny na wczesnym etapie tumorogenezy [129]. Niestety sukcesem nie zakończyły się również badania nad szczepionką terapeutyczną przeciwko *glioblastoma*, w której wykorzystano epitop EGFRvIII [139]. Podsumowując, EGFRvIII może być dobrym celem dla CAR-T, pod warunkiem że ma konkretną rolę biologiczną i że komórki, które wykazują jego ekspresję, to nowotworowe komórki macierzyste albo ogólnie komórki, od których nowotwór jest zależny. Istnieją poważne wątpliwości, czy tak jest.

ZASTOSOWANIE CAR-T W CHOROBYCH NIENOWOTWOROWYCH

Terapia komórkami cytotoksycznymi CAR-T cechuje się imponującą skutecznością w leczeniu nowotworów, zwłaszcza układu krwionośnego, jednak mogą one znaleźć zastosowanie także w leczeniu chorób nienowotworowych, takich jak choroby infekcyjne, alergiczne czy astma.

CHOROBY ALERGICZNE I ASTMA

Choroby alergiczne, a także astma, cechują się przewagą odpowiedzi immunologicznej typu Th2, która może być modulowana przez limfocyty T regulatorowe CD4+ – Treg [140]. Limfocyty B także odgrywają ważną rolę w patogenezie chorób alergicznych poprzez wytwarzanie immunoglobulin typu E, co czyni je atrakcyjnym celem dla komórek CAR-T.

Głównym czynnikiem odpowiedzialnym za wszczęcie reakcji alergicznych jest wiązanie IgE z odpowiednim receptorem IgE. U ludzi istnieją trzy różne receptory IgE: receptor IgE o niskim powinowactwie – FcεRII (CD23), galektyna 3 o niskim powinowactwie lub białko wiążące epsilon (eBP) oraz receptor o wysokim powinowactwie do IgE – FcεRI [2]. Receptor FcεRI jest obecny na komórkach tucznych, eozynofilach i bazofilach, które odpowiadają za uwalnianie mediatorów stanu zapalnego i degranulację, co powoduje reakcje nadwrażliwości typu I i objawy alergiczne [141]. Wykazano, że celem dla komórek CAR-T mogą być komórki, które wykazują ekspresję IgE, zwłaszcza jego transbłonowej formy (mIgE). Takimi komórkami są komórki B ośrodka rozmnażania

(*germinal center B cells* – GCB), plazmoblasty, komórki plazmatyczne lub limfocyty pamięci. Na potwierdzenie tej teorii zaprojektowano i przebadano *in vitro* komórki CAR, zawierające zewnątrzkomórkową domenę łańcucha α FcεRI (FcεRIα) skierowaną przeciwko mIgE [141]. Krążące w płynach biologicznych i tkankach IgE mogą wiązać CAR i blokować ich interakcje z mIgE w tkankach docelowych. W celu rozwiązania tego problemu można zastosować mutanty FcεRIα o niskim powinowactwie. Udowodniono także, że oparte na FcεRIα CD8+ komórki CAR-T o niskim powinowactwie są zdolne do pośredniczenia w silnych odpowiedziach pierwotnych komórek T na komórki docelowe wykazujące obecność mIgE [141].

Rozpuszczalny CD23 (sCD23), który pochodzi z CD23 związanego z błoną limfocytów B, zwiększa produkcję IgE i nasilenie astmy. Dlatego zastosowanie CAR-T w celu zmniejszenia poziomu sCD23 może mieć znaczenie terapeutyczne u pacjentów z chorobami alergicznymi, w tym astmą [142].

Patogeneza astmy alergicznej wiąże się ze zbyt małą liczbą Treg i zmniejszoną aktywnością immunosupresyjną, a także z nadmiernymi odpowiedziami na alergeny zdominowanymi przez komórki Th2, prowadzącymi do zapalenia dróg oddechowych, nadreaktywności dróg oddechowych (*airway hyper responsiveness* – AHR) i odwracalnej niedrożności [143]. Leki rozszerzające oskrzela i leki przeciwzapalne mogą łagodzić objawy u większości pacjentów, ale nie mogą całkowicie wyleczyć astmy. Podjęto próbę przekierowania Treg do płuc i zainicjowania ich aktywacji przez CAR, który rozpoznaje glikoproteinę obecną na powierzchni nabłonka adenozyny – *carcinoembryonic antigen* (CEA) w płucach i przewodzie pokarmowym. Anty-CEA CAR-Treg testowano *in vitro* oraz na mysim transgenicznym modelu astmy CEA. Wyniki wykazały zmniejszone AHR i zmniejszone eozynofilowe zapalenie dróg oddechowych. Komórki CAR-Treg zapobiegały ponadto nadmiernemu wytwarzaniu śluzu w płucach, a także wzrostowi poziomu cytokin swoistych dla alergenu IgE i Th2 u narażonych zwierząt [143]. W tym samym badaniu wykazano, że CAR-Treg były skuteczniejsze niż niemodyfikowane Treg w kontrolowaniu ciężkiej astmy alergicznej.

Ciężką astmą wynikającą z nadwrażliwości na grzyby i alergiczna aspergiloza oskrzelowo-płucna (AAOP) obejmują dwie podgrupy pacjentów z ciężką astmą alergiczną, których przyczyną są grzyby z rodzaju *Aspergillus* [144]. Komórki CAR-T zdolne do rozpoznawania antygeny – epitopów węglowodanowych na powierzchni grzyba *Aspergillus* – można otrzymać przy zastosowaniu zewnątrzkomórkowej domeny receptora rozpoznającego wzorce (PRR) – dektyny-1 (D-CART). Na podstawie wyników eksperymentów *in vitro* i *in vivo* stwierdzono, że komórki D-CAR-T mogą bezpośrednio blokować wzrost

strzępek grzybni *Aspergillus*. Dodatkowo, aby zwiększyć tolerancję organizmu na modyfikowane komórki w leczeniu niegrzybiczych chorób alergicznych można stosować CAR-Treg razem z przeciwygrzybiczymi komórkami CAR-T [145].

W innym badaniu oceniano terapeutyczną rolę pierwszej i drugiej (CD137/CD3ζ) generacji komórek CAR-T ukierunkowanych na IL13Ra u pacjentów z głąkaniem i głąkaniem złośliwym [146]. Ze względu na rolę IL-13 w patogenezie astmy alergicznej receptor IL-13 może być dobrym celem do budowy komórek CAR-T do leczenia astmy. Wybór odpowiedniego antygeny docelowego, który pomógłby w przekierowaniu komórek Treg do dróg oddechowych w astmie, wymaga jednak dalszych badań [147].

CHOROBY ZAKAŻNE

Atrakcyjnymi komórkami CAR w terapii chorób zakaźnych są limfocyty T CD8+, których głównym zadaniem jest eliminowanie zainfekowanych komórek [148]. Ich zastosowanie może być użyteczne u pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B (WZW typu B), spowodowanym przez wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV), którzy zwykle nie rozwijają wystarczająco silnej odpowiedzi immunologicznej, co może prowadzić do rozwoju raka wątroby [149]. Białka otoczki – S, M i L – razem tworzą antygen na powierzchni komórek HBV (HBsAg), który jest ekspozowany na powierzchni zainfekowanych komórek. Stworzono i zbadano komórki CAR-T z receptorem domeny S (S-CAR) dla wszystkich 3 białek otoczki. Zauważono, że liczba hepatocytów, które w cytoplazmie wykazywały ekspresję białka rdzeniowego HBV, liczba wirionów krążących we krwi oraz replikacyjnych form DNA HBV zmniejszyły się u myszy po wprowadzeniu do ich organizmu komórek S-CAR. Po pewnym czasie odnotowano jednak wyczerpanie komórek S-CAR-T oraz wzrost aktywności wirusa poprzez wywołanie odpowiedzi immunologicznej przeciwko ludzkim domenom S-CAR. Trwały efekt przeciwwirusowy uzyskano dopiero w przypadku wprowadzenia S-CAR do specjalnie immunokompetentnych myszy, które tolerowały alogeniczne domeny CAR [150]. W innym badaniu zaprojektowano CAR specyficzny dla HBsAg, a następnie oceniono jego zdolność do rozpoznawania komórek HBV-pozytywnych i cząstek HBsAg *in vitro*, badając skuteczność przeciwko hepatocytom zakażonym HBV w chimerycznym mysim modelu ludzkiej wątroby [151]. Wykazano, że komórki CAR-T anty-HBs-G4m rozpoznają cząsteczki HBsAg i komórki HBV+ *in vitro* i skutecznie obniżają poziomy HBV-DNA i HBsAg *in vivo*, ale nie zabijają ich poprzez działanie cytotoksyczne.

Inną chorobą zakaźną, w której zastosowanie mogą znaleźć komórki CAR jest przewlekłe zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV). U pacjentów w końcowym stadium przewlekłego zakażenia, którzy nie reagują na obecnie dostępne terapie, lekarze zalecają przeszczep wątroby. W wielu przypadkach występuje wysokie ryzyko ponownej infekcji po zakończonym leczeniu WZW typu C, co oznacza potrzebę opracowania alternatywnych metod terapeutycznych [152]. Opracowano komórki CAR-T rozpoznające glikoproteinę HCV E2 (HCV/E2), która jest jednym z najbardziej zmiennych białek wirusowych ekspozowanych na powierzchni zakażonych komórek, a także głównym celem odpowiedzi immunologicznej gospodarza [153]. Komórki anty-HCV/E2 CAR-T wykazały znaczną aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek zakażonych HCV.

Także wirus grypy A, który był przyczyną zarówno ptasiej, jak i świńskiej grypy, przebadano pod kątem potencjalnego zastosowania terapeutycznego dla komórek CAR-T [154]. Celem dla tych komórek może być konserwatywny region białka M2, który wykazywał ekspresję na powierzchni zakażonych komórek zarówno w doświadczeniach *in vitro*, jak i *in vivo*, czego skutkiem było zmniejszenie miana wirusa w płucach myszy po wprowadzeniu do ich organizmu komórek CAR-T.

COVID-19

Możliwość wykorzystania modyfikowanych komórek odpornościowych przeciwko komórkom zainfekowanym przez wirusa wzbudza ostatnio zainteresowanie wśród naukowców w kontekście leczenia choroby COVID-19. Obiecujące rozwiązanie opiera się na limfocytach efektorowych wrodzonej odporności – komórkach naturalnych zabójców (NK), których głównym zadaniem jest unicestwienie komórek nowotworowych oraz zakażonych wirusem. Komórki NK działają poprzez bezpośrednie rozpoznawanie białek wirusowych lub hamowanie sygnalizacji receptora NK w przypadku obniżonej ilości MHC klasy I na powierzchni zakażonej komórki [155].

Próby modyfikacji komórek NK polegały na ich ukierunkowaniu przeciwko białku wypustowemu (białku S) SARS-CoV-2 poprzez domenę CR3022 scFv, która jest silnym przeciwciałem neutralizującym dla SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2 [156]. Dowiedziono, że komórki CR3022-CAR-NK były w stanie wyeliminować komórki zakażone SARS-CoV-2 *in vitro*. Obecnie istnieje tylko jedno badanie kliniczne (NCT04324996) oceniające bispecyficzne komórki NKG2D-ACE2 CAR-NK jako obiecującą terapię COVID-19. NKG2D to uniwersalny aktywujący receptor komórek NK, który rozpoznaje zakażone komórki, podczas gdy ACE2 jest receptorem wiążącym białko S wirusa SARS-CoV-2.

ZWŁÓKNIENIE SERCA

Zwłóknienie jest procesem patologicznym związanym najczęściej z nadmiernym odkładaniem macierzy zewnątrzkomórkowej w mięśniu sercowym, a także hiperaktywacją i ekspansją fibroblastów, co powoduje zgrubienie zastawek serca. Przerost zastawek oraz utrata elastyczności mogą skutkować zawałem mięśnia sercowego, co może prowadzić do dalszego zwłóknienia i pogłębić jego niewydolność. Obecnie nadal nie istnieje dostępna terapia celowana w leczeniu zwłóknienia mięśnia sercowego. Opracowano CAR-T, które celują w aktywowane fibroblasty serca poprzez rozpoznanie białka aktywacji fibroblastów (FAP) u myszy z indukowanym nadciśnieniem uszkodzeniem serca i zwłóknieniem [157, 158]. Okazało się, że komórki anty-FAP CAR-T powodują znaczne zmniejszenie lub nawet całkowitą eliminację zwłóknienia mięśnia sercowego, a nawet mogą wywołać częściowe przywrócenie skurczowej i rozkurczowej funkcji serca bez żadnych skutków ubocznych.

PODZIĘKOWANIE

Publikacja finansowana ze środków Agencji Badań Medycznych w ramach projektu Polish Chimeric Antigen Receptor T-cell Network, numer 2020/ABM/04/00002.

KONFLIKT INTERESÓW

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

PIŚMIENICTWO

1. Tenspolde M, Zimmermann K, Weber LC, et al. Regulatory T cells engineered with a novel insulin-specific chimeric antigen receptor as a candidate immunotherapy for type 1 diabetes. *J Autoimmun* 2019; 103: 102289.
2. Esmaeilzadeh A, Tahmasebi S, Athari SS. Chimeric antigen receptor – T cell therapy: applications and challenges in treatment of allergy and asthma. *Biomed Pharmacother* 2020; 123. doi:10.1016/j.biopha.2019.109685
3. Gorovits B, Koren E. Immunogenicity of chimeric antigen receptor T-cell therapeutics. *BioDrugs* 2019; 33: 275-84.
4. Sermer D, Brentjens R. CAR T-cell therapy: full speed ahead. *Hematol Oncol* 2019; 37(S1): 95-100.
5. Wang Z, Wu Z, Liu Y, Han W. New development in CAR-T cell therapy. *J Hematol Oncol* 2017; 10: 53.
6. Caratelli S, Sconocchia T, Arriga R, et al. FCγ chimeric receptor-engineered T cells: methodology, advantages, limitations, and clinical relevance. *Front Immunol* 2017; 8: 457.
7. Xenaki KT, Oliveira S, van Bergen en Henegouwen PMP. Antibody or antibody fragments: implications for molecular imaging and targeted therapy of solid tumors. *Front Immunol* 2017; 8: 1287.
8. Srivastava S, Riddell SR. Chimeric antigen receptor T cell therapy: challenges to bench-to-bedside efficacy. *J Immunol* 2018; 200: 459-68.
9. Garrido F, Aptsiauri N. Cancer immune escape: MHC expression in primary tumours versus metastases. *Immunology* 2019; 158: 255-66.
10. Muhammad N, Mao Q, Xia H. CAR T-cells for cancer therapy. *Biotechnol Genet Eng Rev* 2017; 33: 190-226.
11. Wei J, Han X, Bo J, Han W. Target selection for CAR-T therapy. *J Hematol Oncol* 2019; 12: 62.
12. Srivastava S, Riddell SR. Engineering CAR-T cells: design concepts. *Trends Immunol* 2015; 36: 494-502.
13. Minutolo NG, Hollander EE, Powell DJJ. The emergence of universal immune receptor t cell therapy for cancer. *Front Oncol* 2019; 9: 176.
14. Roselli E, Frieling JS, Thorner K, et al. CAR-T engineering: optimizing signal transduction and effector mechanisms. *BioDrugs* 2019; 33: 647-59.
15. Klichinsky M, Ruella M, Shestova O, et al. Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy. *Nat Biotechnol* 2020; 38: 947-53.
16. Depil S, Duchateau P, Grupp SA, et al. 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2020; 19: 185-99.
17. Yan W, Liu Z, Liu J, et al. Application of chimeric antigen receptor T cells in the treatment of hematological malignancies. *Biomed Res Int* 2020; 2020: 4241864.
18. D'Aloia MM, Zizzari IG, Sacchetti B, et al. CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors review-article. *Cell Death Dis* 2018; 9: 282.
19. Maldini CR, Ellis GI, Riley JL. CAR T cells for infection, autoimmunity and allotransplantation. *Nat Rev Immunol* 2018; 18: 605-16.
20. Tyagarajan S, Schmitt D, Acker C, Rutjens E. Autologous cryopreserved leukapheresis cellular material for chimeric antigen receptor T cell manufacture. *Cytotherapy* 2019; 21: 1198-205.
21. Korell F, Laier S, Sauer S, et al. Current challenges in providing good leukapheresis products for manufacturing of CAR-T cells for patients with relapsed/refractory NHL or ALL. *Cells* 2020; 9: 1225.
22. Liu J, Zhou G, Zhang L, Zhao Q. Building potent chimeric antigen receptor T cells with CRISPR genome editing. *Front Immunol* 2019; 10: 456.
23. Tóth G, Szöllösi J, Abken H, et al. A small number of HER2 redirected CAR T cells significantly improves immune response of adoptively transferred mouse lymphocytes against human breast cancer xenografts. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 1039.
24. Holstein SA, Lunning MA. CAR T-cell therapy in hematologic malignancies: a voyage in progress. *Clin Pharmacol Ther* 2020; 107: 112-22.
25. Liu D. CAR-T "the living drugs", immune checkpoint inhibitors, and precision medicine: a new era of cancer therapy. *J Hematol Oncol* 2019; 12: 113.
26. Wagner J, Wickman E, DeRenzo C, Gottschalk S. CAR T cell therapy for solid tumors: bright future or dark reality? *Mol Ther* 2020; 28: 2320-39.
27. Miliotou AN, Papadopoulou LC. CAR T-cell therapy: a new era in cancer immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol* 2018; 19: 5-18.
28. O'Leary MC, Lu X, Huang Y, et al. FDA Approval summary: tisagenlecleucel for treatment of patients with relapsed or refractory

- b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2019; 25: 1142-6.
29. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, et al. Lisocabtagene marelucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet* 2020; 396: 839-52.
 30. Papadouli I, Mueller-Berghaus J, Beuneu C, et al. EMA review of Axicabtagene Ciloleucel (Yescarta) for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma. *Oncologist* 2020; 25: 894-902.
 31. Maude SL, Teachey DT, Porter DL, Grupp SA. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015; 125: 4017-23.
 32. Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, et al. Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2017; 377: 2545-54.
 33. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014; 6: e2014073.
 34. 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: 540-9.
 35. Crisci S, Amitrano F, Saggese M, et al. Overview of current targeted anti-cancer drugs for therapy in onco-hematology. *Medicina* 2019; 55: 414.
 36. Barth E, Malorgio C, Tamaro P. Allogeneic bone marrow transplantation in hematologic disorders of childhood: new trends and controversies. *Haematologica* 2000; 85 (11 Suppl): 2-8.
 37. Mims AS, Blum W. Progress in the problem of relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 2019; 26: 88-95.
 38. Ronson A, Tvito A, Rowe JM. Treatment of relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia in adults. *Curr Oncol Rep* 2016; 18: 39.
 39. Sarkozy C, Sehn LH. Management of relapsed/refractory DLBCL. *Best Pract Res Clin Haematol* 2018; 31: 209-16.
 40. Ho AD, Haas R, Champlin RE. Hematopoietic stem cell transplantation. CRC Press 2000. doi:10.5339/qmj.2007.2.7.
 41. Park JH, Rivière I, Gonen M, et al. Long-term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018; 378: 449-59.
 42. Porter DL, Hwang WT, Frey NV, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med* 2015; 7: 303ra139.
 43. Ramos CA, Grover NS, Beaven AW, et al. Anti-CD30 CAR-T cell therapy in relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol* 2020; 38: 3794-804.
 44. Atanackovic D, Radhakrishnan SV, Bhardwaj N, Luetkens T. Chimeric antigen receptor (CAR) therapy for multiple myeloma. *Br J Haematol* 2016; 172: 685-98.
 45. Cohen AD, Garfall AL, Stadtmauer EA, et al. B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma. *J Clin Invest* 2019; 129: 2210-21.
 46. Wang J, Chen S, Xiao W, et al. CAR-T cells targeting CLL-1 as an approach to treat acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 2018; 11: 7.
 47. Abramson JS. Anti-CD19 CAR T-cell therapy for B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Transfus Med Rev* 2020; 34: 29-33.
 48. Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: mechanisms, manifestations and management. *Blood Rev* 2019; 34: 45-55.
 49. Belin C, Devic P, Ayrignac X, et al. Description of neurotoxicity in a series of patients treated with CAR T-cell therapy. *Sci Rep* 2020; 10: 18997.
 50. Labanieh L, Majzner RG, Mackall CL. Programming CAR-T cells to kill cancer. *Nat Biomed Eng* 2018; 2: 377-91.
 51. Yáñez L, Alarcón A, Sánchez-Escamilla M, Perales MA. How I treat adverse effects of CAR-T cell therapy. *ESMO Open* 2020; 4 (Suppl 4). doi:10.1136/esmoopen-2020-000746.
 52. Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther Oncolytics* 2016; 3: 16011.
 53. Cheng J, Zhao L, Zhang Y, et al. Understanding the mechanisms of resistance to CAR T-cell therapy in malignancies. *Front Oncol* 2019; 9: 1237.
 54. Xu X, Sun Q, Liang X, et al. Mechanisms of relapse after CD19 CAR T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia and its prevention and treatment strategies. *Front Immunol* 2019; 10: 2664.
 55. Ruella M, Barrett DM, Kenderian SS, et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *J Clin Invest* 2016; 126: 3814-26.
 56. Song MK, Park BB, Uhm JE. Resistance mechanisms to CAR T-cell therapy and overcoming strategy in B-cell hematologic malignancies. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 5010.
 57. Oberley MJ, Gaynon PS, Bhojwani D, et al. Myeloid lineage switch following chimeric antigen receptor T-cell therapy in a patient with TCF3-ZNF384 fusion-positive B-lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2018; 65: e27265.
 58. Walker AJ, Majzner RG, Zhang L, et al. Tumor antigen and receptor densities regulate efficacy of a chimeric antigen receptor targeting anaplastic lymphoma kinase. *Mol Ther* 2017; 25: 2189-201.
 59. 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: 20-8.
 60. Jia H, Wang Z, Wang Y, et al. Haploidentical CD19/CD22 bispecific CAR-T cells induced MRD-negative remission in a patient with relapsed and refractory adult B-ALL after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *J Hematol Oncol* 2019; 12: 57.
 61. Shah NN, Maatman T, Hari P, Johnson B. Multi targeted CAR-T cell therapies for B-cell malignancies. *Front Oncol* 2019; 9: 146.
 62. Dai H, Wu Z, Jia H, et al. Bispecific CAR-T cells targeting both CD19 and CD22 for therapy of adults with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia. *J Hematol Oncol* 2020; 13: 3.
 63. Yang J, Jiang P, Zhang X, et al. Anti-CD19/CD22 dual CAR-T therapy for refractory and relapsed B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2019; 134 (Suppl 1): 284.
 64. Schneider D, Xiong Y, Wu D, et al. A tandem CD19/CD20 CAR lentiviral vector drives on-target and off-target antigen modulation in leukemia cell lines. *J Immunother Cancer* 2017; 5: 42.
 65. Tong C, Zhang Y, Liu Y, et al. Optimized tandem CD19/CD20 CAR-engineered T cells in refractory/relapsed B-cell lymphoma. *Blood* 2020; 136: 1632-44.
 66. Shah NN, Johnson BD, Schneider D, et al. Bispecific anti-CD20, anti-CD19 CAR T cells for relapsed B cell malignancies: a phase I dose escalation and expansion trial. *Nat Med* 2020; 26: 1569-75.
 67. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 2015; 15: 486-99.
 68. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2019; 380: 45-56.

69. Li X, Chen W. Mechanisms of failure of chimeric antigen receptor T-cell therapy. *Curr Opin Hematol* 2019; 26: 427-33.
70. Kasakovski D, Xu L, Li Y. T cell senescence and CAR-T cell exhaustion in hematological malignancies. *J Hematol Oncol* 2018; 11: 91.
71. Aleksandrova K, Leise J, Priesner C, et al. Functionality and cell senescence of CD4/CD8-selected CD20 CAR T cells manufactured using the automated CliniMACS Prodigy® Platform. *Transfus Med Hemotherapy* 2019; 46: 47-54.
72. Dey M, Huff WX, Kwon JH, et al. The evolving role of CD8+CD28-immunosenescent T cells in cancer immunology. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 2810.
73. Zhao Y, Shao Q, Peng G. Exhaustion and senescence: two crucial dysfunctional states of T cells in the tumor microenvironment. *Cell Mol Immunol* 2020; 17: 27-35.
74. Long AH, Haso WM, Shern JF, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med* 2015; 21: 581-90.
75. Yang Y, Kohler ME, Chien CD, et al. TCR engagement negatively affects CD8 but not CD4 CAR T cell expansion and leukemic clearance. *Sci Transl Med* 2017; 9: eaag1209.
76. 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: 215ra172.
77. Hosseinkhani N, Derakhshani A, Kooshkaki O, et al. Immune checkpoints and CAR-T cells: the pioneers in future cancer therapies? *Int J Mol Sci* 2020; 21: 8305.
78. Nakazawa T, Natsume A, Nishimura F, et al. Effect of CRISPR/Cas9-mediated PD-1-disrupted primary human third-generation CAR-T cells targeting EGFRvIII on in vitro human glioblastoma cell growth. *Cells* 2020; 9: 998.
79. Wei J, Luo C, Wang Y, et al. PD-1 silencing impairs the anti-tumor function of chimeric antigen receptor modified T cells by inhibiting proliferation activity. *J Immunother Cancer* 2019; 7: 209.
80. Song W, Zhang M. Use of CAR-T cell therapy, PD-1 blockade, and their combination for the treatment of hematological malignancies. *Clin Immunol* 2020; 214: 108382.
81. Yoon DH, Osborn MJ, Tolar J, Kim CJ. 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: 340.
82. Lee YG, Chu H, Lu Y, et al. Regulation of CAR T cell-mediated cytokine release syndrome-like toxicity using low molecular weight adaptors. *Nat Commun* 2019; 10: 2681.
83. Gu X, He D, Li C, et al. Development of inducible cd19-car T cells with a tet-on system for controlled activity and enhanced clinical safety. *Int J Mol Sci* 2018; 19: 3455.
84. Sakemura R, Terakura S, Watanabe K, et al. A novel strategy of switching on/off CD19CAR expression under tetracycline-based system. Poster Present 57th ASH Annu Meet Expo Dec 5-8, 2015, Orlando FL.
85. Zhang RY, Wei D, Liu ZK, et al. Doxycycline inducible chimeric antigen receptor T cells targeting CD147 for hepatocellular carcinoma therapy. *Front Cell Dev Biol* 2019; 7: 233.
86. Sakemura R, Terakura S, Watanabe K, et al. A Tet-On Inducible system for controlling CD19-chimeric antigen receptor expression upon drug administration. *Cancer Immunol Res* 2016; 4: 658-68.
87. Dose-escalating Trial With UniCAR02-T Cells and PSMA Target Module (TMpPSMA) in Patients With Progressive Disease After Standard Systemic Therapy in Cancers With Positive PSMA Marker - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04633148); Registration number: NCT04633148.
88. Suzuki M, Cheung NK V. Disialoganglioside GD2 as a therapeutic target for human diseases. *Expert Opin Ther Targets* 2015; 19: 349-62.
89. HER2-CAR T Cells in Treating Patients With Recurrent Brain or Leptomeningeal Metastases - Full Text View - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03696030); registration number: NCT03696030.
90. T Cells Expressing HER2-specific Chimeric Antigen Receptors(-CAR) for Patients With HER2-Positive CNS Tumors - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02442297); Registration number: NCT02442297.
91. Safety and Activity Study of HER2-Targeted Dual Switch CAR-T Cells (BPX-603) in Subjects With HER2-Positive Solid Tumors - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04650451); Registration number: NCT04650451.
92. Binary Oncolytic Adenovirus in Combination With HER2-Specific Autologous CAR VST, Advanced HER2 Positive Solid Tumors - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03740256); Registration number: NCT03740256.
93. HER2-specific CAR T Cell Locoregional Immunotherapy for HER2-positive Recurrent/Refractory Pediatric CNS Tumors - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03500991); Registration number: NCT03500991.
94. HER2/Mesothelin/Lewis-Y/PSCA/MUC1/GPC3/AXL/EGFR/B7-H3/Claudin18.2-CAR-T Cells Immunotherapy Against Cancers - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03198052); Registration number: NCT03198052.
95. Phase 1b Study of CAR2Anti-CEA CAR-T Cell Hepatic Infusions for Pancreatic Carcinoma Patients With CEA+ Liver Metastases - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03818165); Registration number: NCT03818165.
96. CAR-T Intraperitoneal Infusions for CEA-Expressing Adenocarcinoma Peritoneal Metastases or Malignant Ascites (IPC) - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03682744); Registration number: NCT03682744.
97. CAR-T Hepatic Artery Infusions or Pancreatic Venous Infusions for CEA-Expressing Liver Metastases or Pancreas Cancer - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02850536); Registration number: NCT02850536.
98. CAR-T Hepatic Artery Infusions and Sir-Spheres for Liver Metastases - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02416466); Registration number: NCT02416466.
99. Safety and Efficacy of CEA-Targeted CAR-T Therapy for Relapsed/Refractory CEA+ Cancer - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04348643); Registration number: NCT04348643.
100. Gene Modified Immune Cells (IL13Ralpha2 CAR T Cells) After Conditioning Regimen for the Treatment of Stage IIIC or IV Melanoma - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04119024); Registration number: NCT04119024.
101. IL13Ralpha2-Targeted Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells With or Without Nivolumab and Ipilimumab in Treating Patients With Recurrent or Refractory Glioblastoma - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04003649); Registration number: NCT04003649.
102. Genetically Modified T-cells in Treating Patients With Recurrent or Refractory Malignant Glioma - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02208362); Registration number: NCT02208362.
103. Brain Tumor-Specific Immune Cells (IL13Ralpha2-CAR T Cells) for the Treatment of Leptomeningeal Glioblastoma, Ependymoma, or Medulloblastoma - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04661384); Registration number: NCT04661384.
104. CAR T Cells After Lymphodepletion for the Treatment of IL13Ra2 Positive Recurrent or Refractory Brain Tumors in Children - [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04510051); Registration number: NCT04510051.
105. Zhang BL, Qin DY, Mo ZM, et al. Hurdles of CAR-T cell-based cancer immunotherapy directed against solid tumors. *Sci China Life Sci* 2016; 59: 340-8.
106. Kershaw MH, Wang G, Westwood JA, et al. Redirecting migration of T cells to chemokine secreted from tumors by genetic modification with CXCR2. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 1971-80.

107. Wang G, Lu X, Dey P, et al. Targeting YAP-dependent MDSC infiltration impairs tumor progression. *Cancer Discov* 2016; 6: 80-95.
108. Feig C, Jones JO, Kraman M, et al. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 20212-7.
109. Lasek W, Zagożdżon R, Jakobisiak M. Interleukin 12: Still a promising candidate for tumor immunotherapy? *Cancer Immunol Immunother* 2014; 63: 419-35.
110. Avanzi MP, Yeku O, Li X, et al. Engineered tumor-targeted T cells mediate enhanced anti-tumor efficacy both directly and through activation of the endogenous immune system. *Cell Rep* 2018; 23: 2130-41.
111. Zhang H, Ye ZL, Yuan ZG, et al. New strategies for the treatment of solid tumors with CAR-T cells. *Int J Biol Sci* 2016; 12: 718-29.
112. Mohammed S, Sukumaran S, Bajgain P, et al. Improving chimeric antigen receptor-modified T cell function by reversing the immunosuppressive tumor microenvironment of pancreatic cancer. *Mol Ther* 2017; 25: 249-58.
113. Anderson KG, Stromnes IM, Greenberg PD. Obstacles posed by the tumor microenvironment to T cell activity: a case for synergistic therapies. *Cancer Cell* 2017; 31: 311-25.
114. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, et al. Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-cell therapy. *N Engl J Med* 2016; 375: 2561-9.
115. Miao H, Choi BD, Suryadevara CM, et al. EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor T cells migrate to and kill tumor deposits infiltrating the brain parenchyma in an invasive xenograft model of glioblastoma. *PLoS One* 2014; 9: e94281.
116. Choi BD, Suryadevara CM, Gedeon PC, et al. Intracerebral delivery of a third generation EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor is efficacious against human glioma. *J Clin Neurosci* 2014; 21: 189-90.
117. Goff SL, Morgan RA, Yang JC, et al. Pilot trial of adoptive transfer of chimeric antigen receptor-Transduced t cells targeting egfrviii in patients with glioblastoma. *J Immunother* 2019; 42: 126-35.
118. O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med* 2017; 9: eaaa0984.
119. Hegde M, Corder A, Chow KK, et al. Combinational targeting offsets antigen escape and enhances effector functions of adoptively transferred T cells in glioblastoma. *Mol Ther* 2013; 21: 2087-101.
120. Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, et al. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7727-31.
121. Omidfar K, Shirvani Z. Single domain antibodies: a new concept for epidermal growth factor receptor and EGFRvIII targeting. *DNA Cell Biol* 2012; 31: 1015-26.
122. Gupta P, Han SY, Holgado-Madruga M, et al. Development of an EGFRvIII specific recombinant antibody. *BMC Biotechnol* 2010; 10: 72.
123. Yu X, Sharma KD, Takahashi T, et al. Ligand-independent dimer formation of epidermal growth factor receptor (EGFR) is a step separable from ligand-induced EGFR signaling. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 2547-57.
124. Stec W, Rosiak K, Treda C, et al. Cyclic trans-phosphorylation in a homodimer as the predominant mechanism of EGFRvIII action and regulation. *Oncotarget* 2018; 9: 8560-72.
125. Fan QW, Cheng CK, Gustafson WC, et al. EGFR phosphorylates tumor-derived EGFRvIII driving STAT3/5 and progression in glioblastoma. *Cancer Cell* 2013; 24: 438-49.
126. Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, et al. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2006; 66: 7843-8.
127. Wang SC, Hung MC. Nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor family membrane tyrosine kinase receptors. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 6484-9.
128. Greenall SA, Donoghue JF, Van Sinderen M, et al. EGFRvIII-mediated transactivation of receptor tyrosine kinases in glioma: mechanism and therapeutic implications. *Oncogene* 2015; 34: 5277-87.
129. Rutkowska A, Stoczyńska-Fidelus E, Janik K, et al. EGFRvIII: an oncogene with ambiguous role. *J Oncol* 2019; 2019: 1092587.
130. Zadeh G, Bhat KPL, Aldape K. EGFR and EGFRvIII in glioblastoma: partners in crime. *Cancer Cell* 2013; 24: 403-4.
131. Nathanson DA, Gini B, Mottahedeh J, et al. Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA. *Science* 2014; 343: 72-6.
132. Felsberg J, Hentschel B, Kaulich K, et al. Epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII) positivity in EGFR-amplified glioblastomas: prognostic role and comparison between primary and recurrent tumors. *Clin Cancer Res* 2017; 23: 6846-55.
133. Stockhausen MT, Kristoffersen K, Stobbe L, Poulsen HS. Differentiation of glioblastoma multiforme stem-like cells leads to down-regulation of EGFR and EGFRvIII and decreased tumorigenic and stem-like cell potential. *Cancer Biol Ther* 2014; 15: 216-24.
134. Stec WJ, Rosiak K, Siejka P, et al. Cell line with endogenous EGFRvIII expression is a suitable model for research and drug development purposes. *Oncotarget* 2016; 7: 31907-25.
135. Jordan CT. Cancer stem cells: controversial or just misunderstood? *Cell Stem Cell* 2009; 4: 203-5.
136. Turner KM, Deshpande V, Beyter D, et al. Extrachromosomal oncogene amplification drives tumour evolution and genetic heterogeneity. *Nature* 2017; 543: 122-5.
137. Yan Y, Guo G, Huang J, et al. Current understanding of extrachromosomal circular DNA in cancer pathogenesis and therapeutic resistance. *J Hematol Oncol* 2020; 13: 124.
138. Gu X, Yu J, Chai P, et al. Novel insights into extrachromosomal DNA: redefining the onco-drivers of tumor progression. *J Exp Clin Cancer Res* 2020; 39: 215.
139. Weller M, Butowski N, Tran DD, et al. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18: 1373-85.
140. Martín-Orozco E, Norte-Muñoz M, Martínez-García J. Regulatory T cells in allergy and asthma. *Front Pediatr* 2017; 5: 117.
141. Ward DE, Fay BL, Adejuwon A, et al. Chimeric antigen receptors based on low affinity mutants of Fc RI Re-direct T cell specificity to cells expressing membrane IgE. *Front Immunol* 2018; 9: 2231.
142. Acharya M, Borland G, Edkins AL, et al. CD23/FcεRII: molecular multi-tasking. *Clin Exp Immunol* 2010; 162: 12-23.
143. Skuljec J, Chmielewski M, Happle C, et al. Chimeric antigen receptor-redirected regulatory T cells suppress experimental allergic airway inflammation, a model of asthma. *Front Immunol* 2017; 8: 1125.
144. Moss RB. Treatment options in severe fungal asthma and allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Eur Respir J* 2014; 43: 1487-500.

145. Kumaresan PR, Manuri PR, Albert ND, et al. Bioengineering T cells to target carbohydrate to treat opportunistic fungal infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: 10660-5.
146. Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward. *Nat Rev Clin Oncol* 2016; 13: 370-83.
147. Jethwa H, Adami AA, Maher J. Use of gene-modified regulatory T-cells to control autoimmune and alloimmune pathology: is now the right time? *Clin Immunol* 2014; 150: 51-63.
148. Seif M, Einsele H, Löffler J. CAR T cells beyond cancer: hope for immunomodulatory therapy of infectious diseases. *Front Immunol* 2019; 10: 2711.
149. Krebs K, Böttinger N, Huang LR, et al. T cells expressing a chimeric antigen receptor that binds hepatitis B virus envelope proteins control virus replication in mice. *Gastroenterology* 2013; 145: 456-65.
150. Festag MM, Festag J, Fräßle SP, et al. Evaluation of a fully human, hepatitis B virus-specific chimeric antigen receptor in an immunocompetent mouse model. *Mol Ther* 2019; 27: 947-59.
151. Kruse RL, Shum T, Tashiro H, et al. HBsAg-redirectioned T cells exhibit antiviral activity in HBV-infected human liver chimeric mice. *Cytotherapy* 2018; 20: 697-705.
152. Zmievskaia E, Valiullina A, Ganeeva I, et al. Application of CAR-T cell therapy beyond oncology: autoimmune diseases and viral infections. *Biomedicines* 2021; 9: 59.
153. Sautto GA, Wisskirchen K, Clementi N, et al. Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered t cells redirected against hepatitis C virus (HCV) E2 glycoprotein. *Gut* 2016; 65: 512-23.
154. Talbot SJ. An influenza virus M2 protein specific chimeric antigen receptor modulates influenza A/WSN/33 H1N1 infection in vivo. *Open Virol J* 2013; 7: 28-36.
155. Golchin A. Cell-based therapy for severe COVID-19 patients: clinical trials and cost-utility. *Stem Cell Rev Reports* 2020; 17: 56-62.
156. Ma M, Badeti S, Geng K, Liu D. Efficacy of targeting SARS-CoV-2 by CAR-NK cells. *bioRxiv Prepr Serv Biol* 2020; 2020.08.11.247320. doi:10.1101/2020.08.11.247320.
157. Vagnozzi RJ, Johansen AKZ, Molkentin JD. CARdiac immunotherapy: T cells engineered to treat the fibrotic heart. *Mol Ther* 2019; 27: 1869-71.
158. Aghajanian H, Kimura T, Rurik JG, et al. Targeting cardiac fibrosis with engineered T cells. *Nature* 2019; 573: 430-3.