



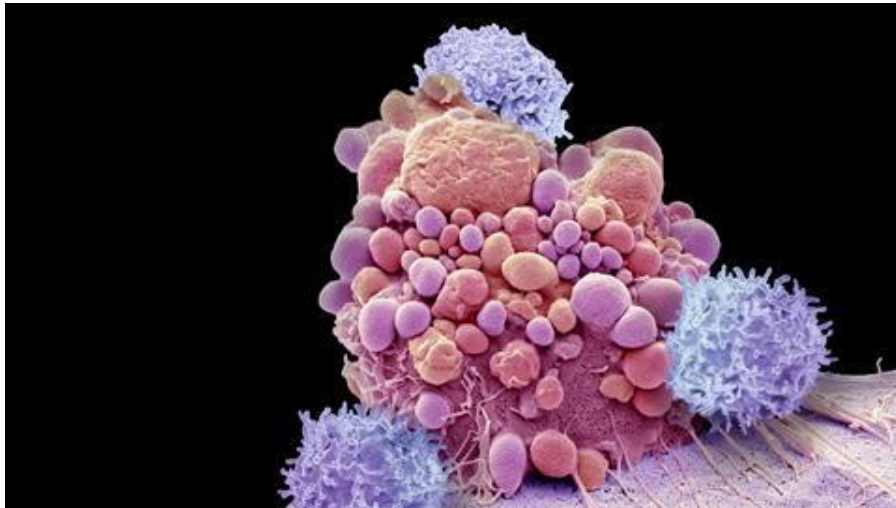
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (ΒΒΕ)»**

**Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (Μ.Δ.Ε)**

**«CAR T-cell therapy σε υγρούς και στερεούς όγκους»**



**Τόλης Ραφαήλ-Κωνσταντίνος**

**Επιβλέπων: Κούκλης Παναγιώτης – Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας**

**Ιωάννινα 2022**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ  
ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (BBE)»**

**Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (Μ.Δ.Ε)**

**Διπλωματική εργασία**

**«CAR T-cell therapy σε υγρούς και στερεούς όγκους»**

**Τόλης Ραφαήλ-Κωνσταντίνος**

**Επιβλέπων: Κούκλης Παναγιώτης - Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας**

**Ιωάννινα 2022**

«Η έγκριση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Όνοματεπώνυμο υποψήφιου φοιτητή: Τόλης Ραφαήλ-Κωνσταντίνος

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (ΜΔΕ) «CAR T-cell therapy σε υγρούς και στερεούς όγκους»

Ημερομηνία Παρουσίασης: 13/7/2022

Επιβλέπων Καθηγητής: Κούκλης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής:

1. **Κούκλης Παναγιώτης**, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. **Αγγελίδης Χαράλαμπος**, Ομότιμος Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. **Βεζυράκη Πατρόνα**, Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία συντάχθηκε κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2021-2022 στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες» του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω, τον καθηγητή μου, Κούκλη Παναγιώτη - Επίκουρο Καθηγητή Γενικής Βιολογίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην εκπόνηση της συγκεκριμένης εργασίας και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή Γενικής Βιολογίας, Αγγελίδα Χαράλαμπο και την Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Βεζυράκη Πατρώνα, για την μετάδοση των γνώσεων καθ' όλη την διάρκεια της φοίτησής μου.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους γονείς μου, την φίλη μου και το κουνέλι μας που με στήριξαν και με στηρίζουν.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	1
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ	8
Εισαγωγικά στοιχεία	11
T λεμφοκύτταρα	12
MHC περιορισμός	12
CD4 <sup>+</sup> και CD8 <sup>+</sup>	13
Τονικό σήμα στα T λεμφοκύτταρα	14
TCR	15
<b><i>ΚΕΦ. 1 ΔΟΜΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΟΥ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ</i></b>	
Βασική Δομή CAR	17
Εξέλιξη της CAR T θεραπείας	17
Εξωκυτταρική περιοχή	18
TAA's	19
scFv	20
Affinity	21
High affinity	23
Ισχύς πρόσδεσης (Avidity)	25
Τοπολογία του επίτοπου στόχου	26
Άλλοι εξωκυττάριοι μηχανισμοί αναγνώρισης	27
Fab-based CARs	27
Nanobodies	28
Spacer/ Hinge domain (HD)	28
Διαμεμβρανική περιοχή (TMD)	31
Ενδοκυτταρική περιοχή (ICD)	32

Άλλοι στόχοι	34
<b><i>ΚΕΦ. 2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ CAR T ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ</i></b>	
Λευκαφαίρεση	36
Ex vivo ανάπτυξη	36
Κυτταρικοί T πληθυσμοί	36
Αυτόλογα και ετερόλογα T λεμφοκύτταρα	37
Χημειοθεραπεία καταστροφής λεμφοκυττάρων	38
Τρόποι μεταφοράς του CAR διαγονιδίου	39
Ιικοί φορείς	39
Κατασκευή και ασφάλεια ικών φορέων	40
Άλλα μη-ικά συστήματα γονιδιακής μεταφοράς	41
Συστήματα τρανσποζονίων	41
Ηλεκτροδιάτρηση	42
<b><i>ΚΕΦ. 3 ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΚΑΙ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ</i></b>	
Εγκεκριμένες θεραπείες	43
Συνδυαστικές προσεγγίσεις	46
Immune Checkpoint Inhibitors	46
Suicide γονίδια	47
CAR T λεμφοκύτταρα διπλής στόχευσης	47
<b><i>ΚΕΦ. 4 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΑΛΛΕΣ ΔΥΣΚΟΛΙΕΣ</i></b>	
CRS	50
Πρόληψη και διαχείριση CRS	51
Συστήματα βαθμολόγησης CRS	52
HLH/MAS	55
ICANS-νευροτοξικότητες	55
Εύρος συμπτωμάτων και ταξινόμηση ICANS	56
Αίτια και Παράγοντες εκδήλωσης ICANS	58
Αντιμετώπιση ICANS	59
GVHD	59
Προέλευση των CAR T cells και GVHD	60



GVHD από αλλογενή και ψευδό-αλλογενή CAR T cells	60
Γονιδιακή επεξεργασία και πρόληψη	61
Virus-specific T cells (VSTs)	62
Εναλλακτικές πηγές	63
Τονικό σήμα και εξασθένιση των CAR T cells	63
On-target off-tumor τοξικότητες	65
Απλασία B λεμφοκυττάρων	65
Υποτροπές	66
CD19 αρνητική υποτροπή	67
Lineage switch	68
<b><i>ΚΕΦ. 5 ΣΤΕΡΕΟΙ ΟΓΚΟΙ</i></b>	
Αντιγόνα Στόχοι Στερεών Όγκων	69
Νεοαντιγόνα (Neoantigens)	70
Φυσικά εμπόδια	70
Μικροπεριβάλλον όγκου – tumor microenvironment (TME)	73
Κυτταρικά συστατικά μικροπεριβάλλοντος του όγκου	73
Ανοσοκύτταρα	73
T λεμφοκύτταρα	73
B λεμφοκύτταρα	75
Μακροφάγα	76
Μυελικά Κατασταλτικά κύτταρα	77
Ουδετερόφιλα	78
Δενδριτικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα	78
Στρωματικά κύτταρα	79
Ενδοθηλιακά κύτταρα	79
Ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο	80
Λιποκύτταρα	81
Αστεροειδή περικύτταρα	82
Μη κυτταρικά συστατικά του μικροπεριβάλλοντος του όγκου	82
Εξωκυττάρια Μήτρα	82

Εξωσώματα	83
CAR T cells σε στερεούς όγκους ανά ιστολογική προέλευση	84
Καρκίνος πνεύμονα	84
Καρκίνος μαστού	85
Γλοίωμα	86
Καρκίνος παχέος εντέρου	88
Νευροβλάστωμα	89
Καρκίνος του προστάτη	90
Καρκίνος του θυρεοειδούς	91
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	91
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	92

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### «CAR T-cell therapy σε υγρούς και στερεούς όγκους»

#### Ραφαήλ-Κωνσταντίνος Τόλης

Η CAR T cell θεραπεία αποτελεί ένα είδος ανοσοθεραπείας που κάνει χρήση συνθετικών, χημικών αντιγονικών υποδοχέων (CARs) επαναπρογραμματίζοντας έτσι την αντιγονική ειδικότητα των T λεμφοκυττάρων και τις λειτουργίες τους. Τα γενετικά αυτά τροποποιημένα T λεμφοκύτταρα αναπτύσσονται στο εργαστήριο και στην συνέχεια εγχέονται στον ασθενή, παρέχοντας του την δυνατότητα να καταπολεμήσει συγκεκριμένους τύπους ασθενειών, όπως ο καρκίνος. Η CAR T cell θεραπεία έχει επηρεάσει θετικά την προσέγγιση στην εξατομικευμένη αντικαρκινική θεραπεία, ειδικά σε αιματολογικές κακοήθειες, αλλάζοντας έτσι την οπτική στην θεραπεία βασισμένη σε T λεμφοκύτταρα. Η ανεξάρτητη συμπλέγματος μείζονος ιστοσυμβατότητας αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων μέσω του CAR στην κυτταρική επιφάνεια των τροποποιημένων T λεμφοκυττάρων, έχει οδηγήσει στην ύπαρξη μιας πληθώρας μορίων στόχων για την θεραπεία μιας ευρείας γκάμας όγκων. Η στόχευση του CD19, ένα μόριο κυτταρικής επιφάνειας που εκφράζεται στα φυσιολογικά B λεμφοκύτταρα, καθώς και στις περισσότερες κακοήθειες B κυττάρων, και του BCMA, το οποίο εκφράζεται σε διαφοροποιημένα B λεμφοκύτταρα και καρκινικά πλασματοκύτταρα, επέφερε εξαιρετικά αποτελέσματα σε υποτροπιάζουσες ή ανθεκτικές μορφές καρκίνου, όπως λευχαιμίες, λεμφώματα και πολλαπλό μυέλωμα, παρουσιάζοντας υψηλά ποσοστά ολικής ύφεσης σε αρκετούς ασθενείς. Παρά τα θετικά αποτελέσματα σε αιματολογικές κακοήθειες, η CAR T θεραπεία συνοδεύεται και από σοβαρές τοξικότητες. Παρενέργειες, όπως το σύνδρομο απελευθέρωσης κυτοκινών και οι νευρολογικές τοξικότητες, αποτελούν μεγάλο κίνδυνο στην ασφάλεια του ασθενή μετά την έγχυση της θεραπείας. Παρ' όλα αυτά, η μεταφορά της CAR T θεραπείας στην αγωγή των στερεών όγκων αποτελεί ακόμα μια δύσκολη πρόκληση λόγω της ετερογένειας που χαρακτηρίζει αυτούς τους όγκους, των φυσικών εμποδίων τους και της ιδιαίτερης ανοσοκατασταλτικής φύσης του μικροπεριβάλλοντός τους.

## **Abstract**

### **“CAR T-cell therapy in liquid and solid tumors”**

**Raphael-Konstantinos Tolis**

CAR T cell therapy is a type of immunotherapy that utilizes synthetic, chimeric antigen receptors (CARs) to reprogram T cell antigen specificity and function. These genetically modified T cells are expanded in the lab and then infused into the patient, granting them the ability to fight certain types of diseases such as cancer. CAR T cell therapy has changed the way we view personalized cancer treatment especially in hematologic malignancies, altering the landscape of T cell-based immunotherapy. The MHC-independent CAR-mediated T cell recognition of malignant cells has led to a plethora of targets being tested for a wide variety of tumors. The targeting of CD19, a cell surface molecule expressed on normal B cells as well as in a vast majority of B cell malignancies, and BCMA, expressed on differentiated B cells and cancerous plasma cells, showed great results in the treatment of relapsed or refractory leukemia, lymphoma, and multiple myeloma, with significant clinical responses and high rates of complete remission. Despite the durable remissions in hematologic malignancies, CAR T cell therapy is limited by potentially severe toxicities. Cytokine release syndrome and neurological toxicities are still of great concern to the safety issue following CAR T cell infusion. Treatment of solid tumors using CAR T cell therapy is still a major challenge due to the heterogeneity of such tumors, their physical barriers, and the highly immunosuppressive nature of the tumor microenvironment.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

aAPCs: artificial antigen presenting cells  
 ACT: adoptive cell therapy/transfer  
 aGVHD: acute graft-versus-host disease  
 AICD: activation induced cell death  
 AML: acute myeloid leukemia  
 APC: antigen presenting cell  
 ATP: adenosine triphosphate  
 B-ALL: B cell acute lymphoblastic leukemia  
 B-CLL: B cell chronic lymphoblastic leukemia  
 B7-H3: B7 Homolog 3  
 BCMA: B cell maturation antigen  
 BMP: bone morphogenetic protein  
 CAFs: cancer-associated fibroblasts  
 CAR: chimeric antigen receptor  
 CCL: C-C motif ligand  
 CD: cluster of differentiation  
 CEA: carcinoembryonic antigen  
 cGVHD: chronic graft-versus-host disease  
 C<sub>H</sub>: heavy chain constant region  
 CLP: common lymphoid progenitor  
 CR: complete remission  
 CRP: C reactive protein  
 CRS: cytokine release syndrome  
 CSF: cerebrospinal fluid  
 cTECs: cortical thymic epithelial cells  
 CTL: cytotoxic T lymphocytes  
 CTLA-4: cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4  
 CXCL: C-X-C motif chemokine ligand  
 DCs: dendritic cells  
 DLBCL: diffuse large B cell lymphoma  
 DTC: differentiated thyroid cancer  
 ECM: extracellular matrix  
 EGFRvIII: epidermal growth factor receptor variant III  
 EndTM: endothelial to mesenchymal transition  
 Fab: fragment antigen-binding  
 FAP: fibroblast activation protein  
 FDC: follicular dendritic cell  
 FR $\beta$ : folate receptor  $\beta$   
 GALV: gibbon ape leukemia virus  
 GBM: glioblastoma multiforme  
 GD2: ganglioside 2  
 GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor  
 GUCY2C: Guanylyl cyclase C  
 GVHD: graft-versus-host disease  
 HA: high affinity  
 HD: hinge domain  
 HER2: human epidermal growth factor receptor 2  
 HIF: hypoxia inducible factor

HIV: human immunodeficiency virus  
HLA: human leukocyte antigen  
HLH: hemophagocytic lymphohistiocytosis  
HPSE: heparanase  
HRE: hypoxia response element  
HSCT: hematopoietic stem cell transplantation  
HSPGs: heparan sulfate proteoglycans  
HSV: herpes simplex virus  
iC9: inducible caspase 9  
ICAM1: intercellular adhesion molecule  
ICANS: immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome  
ICD: intracellular domain  
ICE: immune effector cell-associated encephalopathy  
ICOS: inducible costimulator  
ICOS-L: inducible costimulator ligand  
IFN $\gamma$ : interferon-gamma  
Ig: immunoglobulin  
IL: interleukin  
IL13R $\alpha$ 2: interleukin 13 receptor  $\alpha$ 2  
iNKT: invariant natural killer T cell  
iPSCs: induced pluripotent stem cells  
ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif  
K<sub>D</sub>: dissociation constant  
KLF6: Kruppel like factor 6  
LA: low affinity  
LAT: linker for activation of T cells  
LBD: ligand binding domain  
LFA-1: lymphocyte function-associated antigen-1  
LTR: long terminal repeat  
mAb: monoclonal antibody  
MAPK: mitogen-activated protein kinase  
MAS: macrophage activation syndrome  
MCL: mantle cell lymphoma  
MDSCs: myeloid-derived suppressor cells  
MHC: major histocompatibility complex  
MLL-r: mixed-lineage leukemia rearrangement  
MM: multiple myeloma  
MMLV: Moloney murine leukemia virus  
MMP: metalloproteinase  
MSLN: mesothelin  
mTECs: medullary thymic epithelial cells  
mTOR: mammalian target of rapamycin  
NFAT: nuclear factor of activated T cells  
NHL: non-Hodgkin lymphoma  
NK: Natural Killer  
NKG2D: Natural Killer group 2D  
NSCLC: non-small cell lung cancer  
PBMC: peripheral blood mononuclear cell  
PD-1: programmed cell death protein-1  
PD-L1: programmed death ligand-1

PDGF: platelet-derived growth factor  
PSCA: prostate stem cell antigen  
PSMA: prostate specific membrane antigen  
PTEN: phosphatase and tensin homolog  
R/R: relapsed or refractory  
ROR1: receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1  
ROS: reactive oxygen species  
Runx3: runt-related transcription factor 3  
scFv: single-chain variable fragment  
sCR: stringent complete remission  
SHP: SH2 containing protein tyrosine phosphatase  
sIL2R $\alpha$ : soluble IL-2 receptor  $\alpha$   
SIN: self-inactivating  
SNV: single nucleotide variant  
SP: single positive  
TAA: tumor-associated antigen  
TALEN: transcription activator-like effector nuclease  
TAMs: tumor-associated macrophages  
TANs: tumor-associated neutrophils  
TBX21: T-Box transcription factor 21  
T<sub>CM</sub>: memory T cells  
TCR: T cell receptor  
T<sub>E</sub>: effector T cells  
tEGFR: truncated epidermal growth factor receptor  
T<sub>EM</sub>: effector memory T cells  
TF: transcription factor  
TGF: transforming growth factor  
ThPOK: T-helper-inducing POZ/Krueppel-like factor  
TIL: tumor infiltrating lymphocyte  
TMD: transmembrane domain  
TME: tumor microenvironment  
T<sub>N</sub>: naive T cell  
TNBC: triple-negative breast cancer  
TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$   
T<sub>regs</sub>: regulatory T cells  
TRUCK: T cells redirected for antigen-unrestricted cytokine-initiated killing  
TSA: tumor specific antigen  
TSHR: thyroid-stimulating hormone receptor  
VCAM-1: vascular cell adhesion molecule  
VEGF: vascular endothelial growth factor  
V<sub>H</sub>: variable part of Ig heavy chain  
V<sub>L</sub>: variable part of Ig light chain  
VST: virus-specific T cell  
WT: wild type  
ZAP-70: zeta-chain-associated protein kinase-70

## ***CAR T-cell therapy σε υγρούς και στερεούς όγκους***

### **Εισαγωγικά Στοιχεία**

Ο καρκίνος συνιστά αποτέλεσμα της κατάρρευσης των ρυθμιστικών μηχανισμών ελέγχου της συμπεριφοράς των φυσιολογικών κυττάρων. Η εμφάνιση καρκίνου προκαλείται από τον ανεξέλεγκτο και συνεχή πολλαπλασιασμό κυττάρων τα οποία δεν αποκρίνονται αποτελεσματικά στα σήματα που ελέγχουν τον φυσιολογικό πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση, την επιβίωση τους, διαδικασίες που ρυθμίζονται προσεκτικά έτσι ώστε να επικρατεί ισορροπία στον οργανισμό. Η έλλειψη μηχανισμών ελέγχου του πολλαπλασιασμού χαρακτηρίζει τα καρκινικά κύτταρα διακρίνοντας τα από τα φυσιολογικά, προσδίδοντας τους παράλληλα μοναδικές ιδιότητες, συμπεριφορά αλλά και αλληλεπίδραση με τα γειτονικά κύτταρα (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Η ανοσοθεραπεία αποτελεί μια από τις σημαντικότερες θεραπευτικές μεθόδους καταπολέμησης ποικίλων τύπου καρκίνου, ρυθμίζοντας το ανοσοποιητικό σύστημα με στόχο την εξάλειψη όγκων. Ένας τύπος ανοσοθεραπείας είναι και η Adoptive Cell Therapy/Transfer (ACT), γνωστή και ως κυτταρική θεραπεία, με ιστορία περίπου 30 χρόνων, κάνοντας σε αυτό το διάστημα σημαντικά βήματα στον χώρο της αντικαρκινικής θεραπείας. Μερικές από τις ACT προσεγγίσεις περιλαμβάνουν πολλαπλασιασμό κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ κάποιες άλλες μορφές συμπεριέχουν και την τροποποίηση των ανοσοκυττάρων μέσα από γονιδιακή μεταφορά για την ενίσχυση των ικανοτήτων τους (Rosenberg, Restifo, Yang, Morgan, & Dudley, 2008). Μια πολλά υποσχόμενη τέτοια προσέγγιση αποτελεί και η CAR (chimeric antigen receptor) T-cell therapy, με σοβαρή αντικαρκινική δράση σε αιματολογικές κακοήθειες. Μαζί με τις Tumor-Infiltrating Lymphocyte (TIL), Engineered T cell receptor (TCR) και Natural Killer (NK) cell θεραπείες, αποτελούν τον βασικό κορμό της αντικαρκινικής κυτταρικής θεραπείας (Dudley & Rosenberg, 2007; J. A. Myers & Miller, 2021; Sterner & Sterner, 2021). Η CAR T cell θεραπεία περιλαμβάνει επαναπρογραμματισμό T λεμφοκυττάρων με χημειοκίτους αντιγονικούς υποδοχείς (CARs), εξειδικευμένους για την αναγνώριση και καταστροφή καρκινικών κυττάρων-στόχων ανεξαρτήτως ιστοσυμβατότητας (Rivière & Sadelain, 2017). Τ λεμφοκύτταρα συλλέγονται συνήθως από τον ασθενή, τροποποιούνται για την έκφραση του συνθετικού CAR υποδοχέα και μεταφέρονται στον ασθενή (June, O'Connor, Kawalekar, Ghassemi, & Milone, 2018). Οι CARs είναι εξειδικευμένοι, συνθετικοί, διαμεμβρανικοί υποδοχείς που επαναπρογραμματίζουν την αντιγονική ειδικότητα των T λεμφοκυττάρων (Feucht & Sadelain, 2020). Παρά την προσπάθεια δημιουργίας αρκετών τέτοιων συνθετικών υποδοχέων με την πάροδο του χρόνου και την εξέλιξη της κατανόησης πάνω στο θέμα αυτό, το βασικό μοτίβο είναι το εξής: συνδυασμός αναγνώρισης και δέσμευσης αντιγόνου ανεξαρτήτως Major Histocompatibility Complex (MHC) έκφρασης και ενδοκυτταρική TCR (T cell receptor) σηματοδότηση. Ο συνδυασμός αυτός δίνει μια μεγαλύτερη ευελιξία και μια πιο οικουμενική διάσταση στην αναγνώριση και σύνδεση με το μόριο στόχο σε σχέση με τους φυσιολογικούς υποδοχείς των T λεμφοκυττάρων (Rivière & Sadelain, 2017). Η τροποποίηση και ο επαναπρογραμματισμός της λειτουργίας των T λεμφοκυττάρων δίνει την δυνατότητα αναγνώρισης των επιθυμητών μορίων κυτταρικής επιφάνειας και την αποτελεσματική εξουδετέρωση των καρκινικών κυττάρων-στόχων, όπως έχει φανεί σε διάφορους υγρούς όγκους π.χ. λευχαιμίες και λεμφώματα με τις πρώτες



εγκεκριμένες θεραπείες εναντίον αιματολογικών κακοηθειών να έρχονται στο προσκήνιο το 2017 για την αγωγή οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας Β κυττάρων (B-cell acute lymphoblastic leukemia, B-ALL) και διάχυτου από μεγάλα Β κύτταρα λεμφώματος (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) (Sermer & Brentjens, 2019). Παρ' όλα αυτά το μέλλον είναι αβέβαιο ακόμα στην εφαρμογή της θεραπευτικής προσέγγισης αυτής στους στερεούς όγκους, λόγω της πολυπλοκότητας της φύσης των όγκων αυτών και των φυσικών εμποδίων με τα οποία έρχονται αντιμέτωπα τα CAR T cells μετά την έγχυση τους στον ασθενή (S. Ma et al., 2019).

### **T λεμφοκύτταρα**

Τα T λεμφοκύτταρα αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι του ανοσοποιητικού συστήματος και της ανοσολογικής απόκρισης. Ανήκουν στην κατηγορία των λευκοκυττάρων και προέρχονται από multipotent HSCs (Haemopoietic Stem cells) λεμφικής προέλευσης/καταγωγής. Προέρχονται δηλαδή, μαζί με τα Β λεμφοκύτταρα, από κοινούς λεμφογενείς προγόνους (common lymphoid progenitors, CLPs) μετά από lineage commitment μέσω σταδίων διαφοροποίησης των HSCs του μυελού των οστών κατά την διαδικασία της αιμοποίησης. Τα T λεμφοκύτταρα αποτελούν τον βασικό λίθο της επίκτητης/προσαρμοστικής ανοσίας, της εξειδικευμένης δηλαδή απόκρισης του ανοσοποιητικού σε παθογόνες/ξένες ουσίες και μικροοργανισμούς (Famili, Wiekmeijer, & Staal, 2017). Κατόπιν της εγγενούς/έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης, που αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού προωθώντας την φαγοκυττάρωση από μονοκύτταρα και άλλα κοκκιοκύτταρα της κατηγορίας των φαγοκυττάρων, επαγγελματικά επικουρικά ή αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (antigen presenting cells, APCs) διασπούν τους εξωγενείς παράγοντες/αντιγόνα, που έχουν αναγνωρίσει και φαγοκυτταρώσει, σε αντιγονικά πεπτιδικά θραύσματα. Η αντιγονοπαρουσίαση διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και συνεπακόλουθα της επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης, με πιο εξειδικευμένο χαρακτήρα από την εγγενή-μη ειδική απόκριση. Τα επεξεργασμένα πεπτιδικά θραύσματα προσδένονται με μόρια του συμπλέγματος μείζονος ιστοσυμβατότητας (MHC) και εκτίθενται στην επιφάνεια των APCs (Banchereau & Steinman, 1998; Steinman & Hemmi, 2006).

### **MHC περιορισμός**

Το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας αποτελεί ένα σετ ιδιαίτερα πολυμορφικών γονιδίων που παρατηρείται σε σχεδόν όλα τα σπονδυλωτά και ιδιαίτερα στα θηλαστικά. Το MHC κωδικοποιεί τα MHC μόρια κυτταρικής επιφανείας που είναι καθοριστικής σημασίας στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και την διάκριση αυτό- και εξωγενούς (άλλο-) αντιγόνου. Οι ομάδες των γονιδίων αυτές διαχωρίζονται σε 3 τάξεις: MHC class I, class II και III (Zareie, Farenc, & La Gruta, 2020). Το σύστημα αυτό στον άνθρωπο ονομάστηκε HLA (Human Leukocyte Antigen), ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο δηλαδή και αποτελείται από πάνω από 200, ιδιαίτερα πολυμορφικά, γονίδια στο βραχύ σκέλος του 6<sup>ου</sup> χρωμοσώματος. Το HLA αποτελείται από τρεις περιοχές που έχουν χαρακτηριστεί ως class I, II και III με βάση τη δομή και τη λειτουργία των γονιδιακών τους προϊόντων. HLA class I μόρια: HLA-A, HLA-B, HLA-C. HLA class II μόρια: HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DO, HLA-DM. Η περιοχή κατηγορίας III περιέχει γονίδια που κωδικοποιούν ρυθμιστικά μόρια του ανοσοποιητικού

συστήματος (Ujvari & Belon, 2011). Τα μόρια των MHC τάξεων I και II παίρνουν μέρος στην αντιγονοπαρουσίαση και κατ' επέκταση στην ενεργοποίηση των T κυττάρων (Little & Parham, 1999). MHC τάξης I μόρια εκφράζονται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα του οργανισμού και σχετίζονται με την έκθεση αντιγονικών πεπτιδίων ενδογενούς προέλευσης, προϊόντα πρωτεολυτικής επεξεργασίας από προτεασώματα. MHC τάξης II μόρια εκφράζονται στα επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (δενδριτικά, μακροφάγα, B λεμφοκύτταρα) και σχετίζονται με την έκθεση εξωγενών αντιγονικών πεπτιδίων κατά την αντιγονοπαρουσίαση μετά από πρωτεϊνική αποικοδόμηση που ακολουθεί την ενδοκύτωση. Τα T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν πεπτιδικά θραύσματα αντιγόνων ξένης προέλευσης δεσμευμένα από αυτόλογα MHC μόρια, με ανοχή σε αυτοαντιγόνα. Η ιδιότητα αυτή των T λεμφοκυττάρων ονομάζεται MHC restriction, περιορισμός MHC δηλαδή, και είναι φαινόμενο που συνδέεται στενά με την διαδικασία ωρίμανσης των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων στον θύμο αδένα όπου και μεταναστεύουν από τον μυελό των οστών (Larché, 2008; Thapa & Farber, 2019).

### **CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup>**

Σε αρχικό στάδιο, στον θύμο αδένα τα προγονικά «διπλά-αρνητικά κύτταρα» (double negative), CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, αναφερόμενοι βέβαια στην απουσία έκφρασης των καταλλήλων CD4 και CD8 μορίων επιφανείας που καθορίζουν τον τύπο και λειτουργία των μετέπειτα ώριμων T λεμφοκυττάρων, εκφράζουν τον TCR (αβ TCR) μέσω γονιδιακής αναδιοργάνωσης (TCR gene rearrangement) και preTCR σημάτων (Seo & Taniuchi, 2016). Κατά την σύνδεσή τους με φλοιικά επιθηλιακά θυμικά κύτταρα (cortical thymic epithelial cells, cTECs) που παρουσιάζουν στα ανώριμα T λεμφοκύτταρα αυτοπεπτιδία σε αυτόλογα MHC μόρια, τα αβ «διπλά θετικά» (double positive) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα, με ικανότητα σύνδεσης στο σύμπλοκο αυτοπεπτιδίου με το MHC των θυμικών, παίρνουν ουσιαστικά το πράσινο φως για να συνεχίσουν το ταξίδι τους λαμβάνοντας σήμα επιβίωσης μέσω θετικής επιλογής (Thapa & Farber, 2019). Ανικανότητα σύνδεσης οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης. Θετική επιλογή οδηγεί και σε μεταφορά των T λεμφοκυττάρων στον μυελό του θύμου όπου και παρουσιάζουν CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ή CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, single positive (SP) φαινότυπο. Σε αντίθεση με το παραπάνω, T κύτταρα με πολύ ισχυρή σύνδεση με το σύμπλοκο αυτοπεπτιδίου και MHC που εκτίθεται στην επιφάνεια μυελικών θυμικών κυττάρων (medullary thymic epithelial cells, mTECs), σημάδι μη αυτοανοχής, υπόκεινται σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης μέσα από αρνητική επιλογή. Στα T λεμφοκύτταρα που λαμβάνουν το σήμα επιβίωσης μέσω των παραπάνω διαδικασιών, τα σήματα που δέχονται μέσω της σύνδεσης τους με το αυτοπεπτιδίο-MHC σύμπλοκο, καθορίζουν και την επικράτηση της single positive φύσης τους, μέσω δηλαδή της επικράτησης της CD4 ή CD8 έκφρασης (Geenen, 2021; Kondo, Ohigashi, & Takahama, 2019; Kurd & Robey, 2016; Palmer, 2003).

Ο μηχανισμός βασίζεται σε MHC εξαρτώμενη σηματοδότηση. Σηματοδότηση μέσω σύνδεσης με MHC τάξης II μόρια, οδηγεί σε αυξημένη έκφραση ThPOK (T-helper-inducing POZ/Kruempel-like factor) που περιορίζει την έκφραση του Runx3 (runt-related transcription factor 3) που σχετίζεται με την έκφραση του CD8 μορίου στα T λεμφοκύτταρα. Ο μεταγραφικός παράγοντας ThPOK λειτουργεί ως κύριος ρυθμιστής της διαδικασίας αυτής προωθώντας CD4 commitment μέσα από μείωση έκφρασης του

CD8 και από ενδιάμεσα στάδια με CD4<sup>+</sup>CD8<sup>lo</sup> χαρακτήρα μέχρι την τελική επικράτηση του CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> φαινοτύπου. Σηματοδότηση μέσω σύνδεσης με MHC τάξης I μόρια οδηγεί σε αντίθετα αποτελέσματα, με αυξημένη έκφραση του CD8 και εμφάνιση CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> φαινοτύπου. Μετά από διάστημα μερικών ημερών και περαιτέρω ωρίμανσης, τα SP CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα μπορούν να εξέλθουν του θύμου ως ώριμα πια και λειτουργικά T (Egawa, 2021; He et al., 2008). Τα CD4<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα συνδέονται με MHC τάξης II μόρια κατά την αντιγονοπαρουσίαση με τα APCs, γι' αυτό χαρακτηρίζονται και ως MHC II restricted, ενώ τα CD8<sup>+</sup> T κύτταρα ως MHC I restricted. Οι κύριοι κυτταρικοί τύποι δραστικών T λεμφοκυττάρων, τα βοηθητικά (helper T cells ή T<sub>H</sub>) και τα κυτταροτοξικά (cytotoxic T cells ή CTLs) T λεμφοκύτταρα δηλαδή, προέρχονται από τα CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα αντίστοιχα, μετά την ενεργοποίηση και διαφοροποίηση τους, αποκτώντας έτσι τις δραστικές λειτουργίες τους και φαινότυπο (Mousset et al., 2019; Taniuchi, 2018).

### **Τονικό σήμα στα T λεμφοκύτταρα**

Το τονικό σήμα μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια συστηματική ή χρόνια ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. Το σήμα αυτό αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της ομοιόστασης των T λεμφοκυττάρων. Το τονικό σήμα που σε φυσιολογικά, μη-τροποποιημένα, naïve T λεμφοκύτταρα, επάγεται από μη ειδικές ως προς αντιγόνο (non-Ag-specific) αλληλεπιδράσεις με ώριμα αντιγονοπαρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα (dendritic cells, DCs), ενισχύει την ικανότητα των T λεμφοκυττάρων να αποκριθούν αργότερα σε αλλο-πεπτίδια, όπως τα νεοαντιγόνα όγκων (D. R. Myers, Zikherman, & Roose, 2017). Η αυτοδραστικότητα των ώριμων, μη ενεργοποιημένων, naïve T λεμφοκυττάρων έχει καθοριστεί ήδη από το περιβάλλον του θύμου αδένου, όπου ανώριμα T λεμφοκύτταρα τεστάρονται συνεχώς ως προς την ικανότητα και δύναμη δέσμευσης με αυτοπεπτίδια που εκτίθενται από αντιγονοπαρουσιαστικά θυμικά κύτταρα. High affinity for self, δηλαδή η ισχυρή αλληλεπίδραση με το αυτοπεπτίδιο οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο μέσω αρνητικής επιλογής (Palmer, 2003). Τα ώριμα πια naïve T λεμφοκύτταρα, με την έξοδο τους από τον θύμο, δέχονται συνεχώς ερεθίσματα με συμπλέγματα αυτοπεπτιδίου/MHC μορίων από ώριμα APC DCs στην T cell zone των δευτερογενών λεμφικών οργάνων. Σε αιματολογικές εξετάσεις φαίνεται το τονικό σήμα να χάνεται. Παρατηρείται ίσως έτσι ένα κυκλικό μοτίβο ερεθίσματος στα T λεμφοκύτταρα που προκύπτει από το τονικό σήμα στο λεμφικό σύστημα. Αυτή η low-intermediate δεσμευτική συγγένεια των T λεμφοκυττάρων προς τα αυτοπεπτίδια καθορίζει και την ένταση του τονικού σήματος που ενώ δεν ενεργοποιεί ακριβώς τα T λεμφοκύτταρα, είναι σαν να τα κρατάει σε εγρήγορση μέχρι την πραγματική τους ενεργοποίηση από τον κατάλληλο συνδέτη (Garbi, Hämmerling, Probst, & van den Broek, 2010; Hochweller et al., 2010; D. R. Myers et al., 2017). Στα T λεμφοκύτταρα γνωρίζουμε ότι η υπο/ελλιπής απόκριση σχετίζεται με μειωμένη φωσφορυλίωση (Courtney, Lo, & Weiss, 2018; Smith-Garvin, Koretzky, & Jordan, 2009). Το τονικό σήμα ωθεί σε χαμηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης των σηματοδοτικών περιοχών του TCR, μέσα από φωσφορυλίωση των CD3ζ ITAMs, ενεργοποίηση της Lck και άλλων σηματοδοτικών πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να μην πυροδοτεί κανονική απόκριση. Το τονικό σήμα δηλαδή παράγεται ως αποτέλεσμα μιας λεπτής, δυναμικής ισορροπίας μεταξύ θετικών και αρνητικών ρυθμιστικών παραγόντων της σηματοδότησης του TCR συντελώντας στην ομοιόσταση των T λεμφοκυττάρων (D. R. Myers et al., 2017).

## TCR

Ο υποδοχέας T λεμφοκυττάρου (TCR) αποτελεί ένα αρκετά περίπλοκο διαμεμβρανικό, πρωτεϊνικό σύμπλεγμα, άρρητα συνδεδεμένο με την ζωή και λειτουργία των T λεμφοκυττάρων. Το αντιγονικής αναγνώρισης ετεροδιμερές TCRαβ σε συνδυασμό με τις διμερείς υπομονάδες του CD3 δηλαδή CD3γε, CD3δε, CD3ζζ απαρτίζουν το TCR-CD3 complex του T λεμφοκυττάρου (Mariuzza, Agnihotri, & Orban, 2020). Οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες TCRα και TCRβ (TCRαβ διμερές) διαθέτουν μεταβλητές Ig-like περιοχές αναγνώρισης Vα και Vβ καθώς και σταθερές Cα και Cβ περιοχές στο εξωκυττάριο τμήμα τους, ένα συνδετικό πεπτίδιο, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και μικρές κυτταροπλασματικές ουρές. Παρόμοια, οι CD3γ, CD3δ και CD3ε αλυσίδες διαθέτουν Ig-like εξωκυττάρια περιοχή, συνδετικό πεπτίδιο, διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυτταρική ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif), δηλαδή μια διατηρημένη μικρή αλληλουχία αμινοξέων (διπλή αλληλουχία YXXL/I με 6-8 ενδιάμεσα αμινοξέα) απαραίτητη για την ενεργοποίηση του κυττάρου μέσω φωσφορυλίωσης (Barclay, 1999; Humphrey, Lanier, & Nakamura, 2005; Sunder-Plassmann, Lialios, Madsen, Koyasu, & Reinherz, 1997). Οι CD3ζ αλυσίδες του CD3ζζ ομοδιμερούς διαθέτουν 3 ITAMs έκαστη στην κυτταροπλασματική τους περιοχή δίνοντας έτσι σε αυτές τις CD3 υπομονάδες σηματοδοτικό χαρακτήρα (Bettini et al., 2017). Η σύνδεση του TCR με pMHC γρήγορα πυροδοτεί την φωσφορυλίωση τυροσινών των ITAMs στις CD3ζ αλυσίδες από την Src κινάση τυροσίνης, Lck. Οι φωσφορυλιωμένες ITAMs των δυο CD3ζ αλυσίδων του TCR-CD3 complex, λειτουργούν ως θέση αγκυροβόλησης για την SH2 domain της ZAP-70 (Zeta chain-associated protein kinase 70) κινάσης τυροσίνης, η οποία και φωσφοριώνεται για την ενεργοποίηση της από την Lck. Η Lck χρησιμεύει για την στρατολόγηση και γεφύρωση των LAT και SLP-76 πρωτεϊνών με την ZAP-70. Η ZAP-70 φωσφοριώνει τις σηματοδοτικές αυτές πρωτεΐνες και έτσι ξεκινάει ένας καθοδικός σηματοδοτικός καταρράκτης που οδηγεί στην ενεργοποίηση του T λεμφοκυττάρου και την αντίστοιχη απόκριση. Τα CD4 και CD8 πρωτεϊνικά μόρια κυτταρικής επιφάνειας λειτουργούν ως συν-υποδοχείς του TCR-CD3 complex παίρνοντας μέρος στην σύνδεση και αλληλεπίδραση με το αντίστοιχο pMHC σύμφωνα όπως είδαμε με τον τύπο κυττάρου (Rossy, Williamson, & Gaus, 2012; Simeoni, 2017; Smith-Garvin et al., 2009).



κομματιών που απαρτίζουν το παζλ της δομής των χιμαιρικών αντιγονικών υποδοχέων (Jayaraman et al., 2020).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

### **ΔΟΜΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΟΥ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ**

#### **Βασική Δομή CAR**

Οι chimeric antigen receptors (CARs) αποτελούν συνθετικούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς που επαναπρογραμματίζουν την αντιγονική ειδικότητα των T λεμφοκυττάρων. Η γενική δομή ενός τέτοιου χιμαιρικού αντιγονικού υποδοχέα είναι ως εξής:

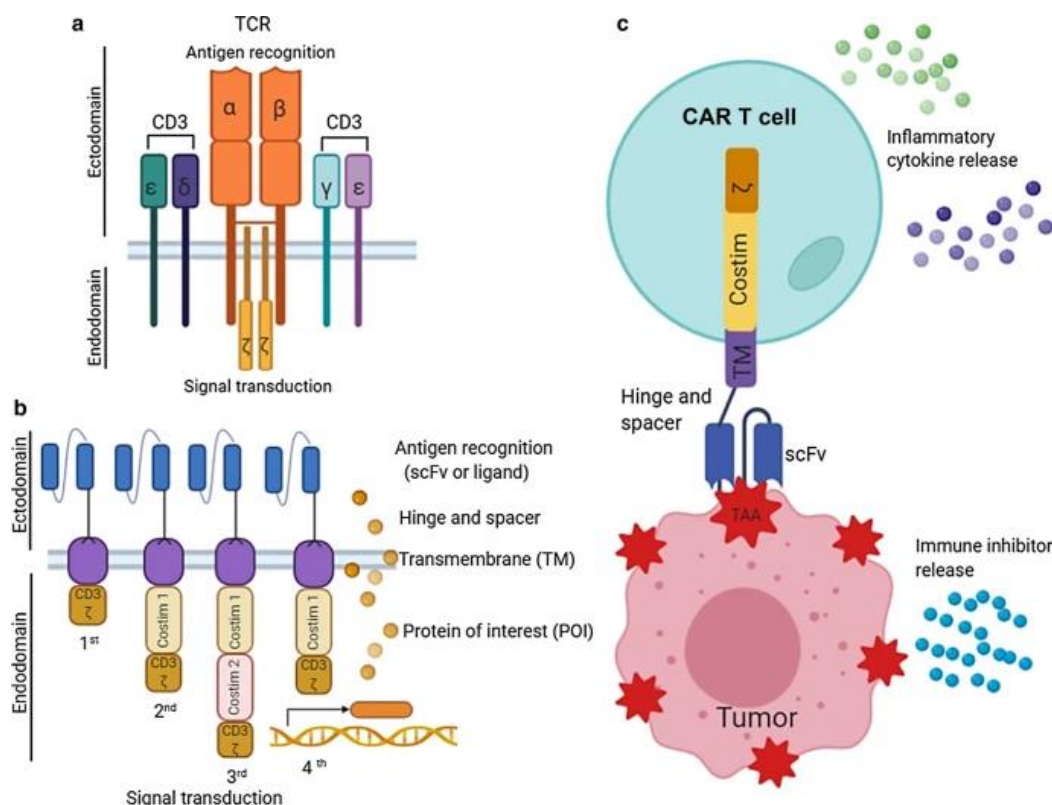
- Εξωκυτταρική περιοχή αναγνώρισης και σύνδεσης με τον συνδέτη, με σύνηθες μέσο μια επικράτεια πρόσδεσης προερχόμενη από την περιοχή scFv (single-chain variable fragment) αντισωμάτων – extracellular/ligand binding domain (LBD)
- Spacer/Hinge domain (HD), που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση, ευκαμψία και έκφραση του CAR
- Διαμεμβρανική περιοχή, που γεφυρώνει τον εξωκυτταρικό μηχανισμό με την ενδοκυτταρική περιοχή, έχοντας παράλληλα σημαντικό ρόλο στην σταθερότητα και έκφραση των CARs – transmembrane domain (TMD)
- Ενδοκυτταρική περιοχή σηματοδότησης, με κεντρικό ρόλο να κατέχουν οι CD3ζ αλυσίδες του TCR-CD3 complex για μια TCR-like σηματοδότηση – intracellular/signaling domain (ICD)

Ο εξωκυτταρικός μηχανισμός αναγνώρισης, το spacer τμήμα, η διαμεμβρανική και η ενδοκυτταρική σηματοδοτική περιοχή αποτελούν την κύρια δομή ενός χιμαιρικού αντιγονικού υποδοχέα. (Rivière & Sadelain, 2017; C. Zhang, Liu, Zhong, & Zhang, 2017)

#### **Εξέλιξη της CAR T θεραπείας**

Το γενικό μοτίβο κατασκευής των CARs ξεκίνησε με έναν scFv μηχανισμό αναγνώρισης σε συνδυασμό με ενδοκυτταρική TCR σηματοδότηση μέσω CD3ζ αλυσίδων. Έτσι γεννήθηκαν οι CARs πρώτης γενιάς γνωστοί και ως T bodies, αλλά παρουσίασαν μικρή αποτελεσματικότητα λόγω χαμηλής σηματοδότησης εξ' αιτίας της απλής σχετικής δομής τους (Eshhar, Waks, & Gross, 2014; Subklewe, von Bergwelt-Baildon, & Humpe, 2019). Έτσι προέκυψε η ιδέα χρήσης συνδιεγερτικών (costimulatory) μορίων του TCR για την ενίσχυση της σηματοδότησης με αποτέλεσμα την κατασκευή CAR υποδοχέων 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> γενιάς. Η χρήση ενός costimulatory μορίου CD28 ή 4-1BB αύξησε κατά πολύ την αποτελεσματικότητα των CAR T cells, με τους 2<sup>ης</sup> γενιάς CARs να χρησιμοποιούνται σε εγκεκριμένες θεραπείες αιματολογικών κακοηθειών (Maher, Brentjens, Gunset, Rivière, & Sadelain, 2002; Subklewe et al., 2019). Με την ταυτόχρονη χρήση δυο ή και περισσότερων costimulatory μορίων

CD28, 4-1BB, OX40, ICOS εμφανίστηκαν οι CARs 3<sup>ης</sup> γενιάς και τα αποτελέσματα τους αξιολογούνται μέχρι και σήμερα. Μελέτες βέβαια ανέδειξαν και μια νέα, 4<sup>η</sup> γενιά CAR T cells, γνωστά και ως TRUCKs, τα οποία είναι «οπλισμένα» και με διαγονίδια για την ρύθμιση έκφρασης και παραγωγής κυτοκινών που θα προσελκύσουν και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού που μπορούν να στοχεύσουν Ag-negative κύτταρα στην περιοχή του όγκου, ταυτόχρονα με την κλασσική αντικαρκινική κυτταρολυτική δράση των CAR T cells (Chmielewski & Abken, 2015).



**Εικόνα 2:** a) Σχηματική απεικόνιση του TCR-CD3 complex ( $TCR\alpha\beta:CD3\gamma\epsilon:CD3\delta\epsilon:CD3\zeta\zeta$ ), b) εξέλιξη των CAR T κυττάρων σύμφωνα με την δομή του CAR υποδοχέα (CAR T cell generations), c) MHC-ανεξάρτητη αναγνώριση καρκινικού κυττάρου μέσω του εξωκυτταρικού μηχανισμού αναγνώρισης και δέσμευσης του χιμαιρικού αντιγονικού υποδοχέα (Land, Musich, Haydar, Krenciute, & Xie, 2020)

### Εξωκυτταρική περιοχή

Η Εξωκυτταρική περιοχή του χιμαιρικού αντιγονικού υποδοχέα αποτελεί το τμήμα αναγνώρισης, σύνδεσης και αλληλεπίδρασης του CAR T λεμφοκυττάρου με το κύτταρο-στόχο, παρέχοντας του την κατάλληλη αντιγονοειδικότητα. Το βασικό πλεονέκτημα των CAR T cells είναι η αναγνώριση και σύνδεση με τον στόχο ανεξαρτήτως συμπλέγματος μείζονος ιστοσυμβατότητας, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα τα οποία είναι MHC/HLA restricted. Η αναγνώριση και η σύνδεση των CARs με τον στόχο τους δεν απαιτεί HLA έκφραση και αντιγονική πεπτιδική επεξεργασία. Δίνεται έτσι στα CAR T cells η δυνατότητα να στοχεύουν καρκινικά κύτταρα με μειωμένη HLA έκφραση και προτεασωμική επεξεργασία αντιγονικού πεπτιδίου, κάτι που περιορίζει τους φυσιολογικούς TCRs, που αναγκαία πρέπει να ταιριάζουν με τον απλότυπο του ατόμου κάτι που θέτει εμπόδια στην φυσιολογική TCR απόκριση στους όγκους (Corse, Gottschalk, & Allison, 2011; Ramos

& Dotti, 2011). Η πυροδότηση των κυτταρολυτικών δραστικών λειτουργιών των CAR T cells, μέσω του σήματος ενεργοποίησης, οδηγεί σε εξωκύτωση κυτταροτοξικών κοκκίων που περιέχουν perforin και granzymes, και έκφραση TNF family ligands στην κυτταρική μεμβράνη των τροποποιημένων T κυττάρων για θάνατο μέσω απόπτωσης κατά την σύνδεση, αποτελώντας με αυτόν τον τρόπο τους δυο βασικούς κυτταρολυτικούς μηχανισμούς των CAR T cells (Benmebarek et al., 2019). Βέβαια, αρκετοί τρόποι όπως θα δούμε έχουν χρησιμοποιηθεί για τον μηχανισμό αναγνώρισης της εξωκυττάριας περιοχής κατά την δημιουργία των CAR T cells όπως scFvs, Fabs, συνδέτες σε συγγενείς υποδοχείς, υποδοχείς για μόρια στόχους, nanobodies και μικρά πεπτιδία (Jayaraman et al., 2020; Kahlon et al., 2004; Leibman et al., 2017; Srivastava & Riddell, 2015; Xie et al., 2019).

### TAAs

Ο επαναπρογραμματισμός των CAR T cells τους δίνει την δυνατότητα στόχευσης του επιθυμητού μορίου στο κύτταρο που θέλουμε να εξαλείψουμε. Αναφερόμαστε φυσικά σε μόρια κυτταρικής επιφανείας, γνωστά και ως TAAs (tumor-associated Antigens), αντιγόνα σχετιζόμενα με τον όγκο μπορούμε να πούμε στα Ελληνικά, και αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα κριτήρια μελέτης και επιλογής, καθώς θα επηρεάσουν όχι μόνο την έκβαση του εγχειρήματος εξάλειψης αλλά και τον ίδιο τον ασθενή καθώς μιλάμε για κυτταρικό θάνατο των κυττάρων που φέρουν το ανάλογο μόριο-στόχο των CAR T cells. Βέβαια, δεν είναι τόσο απλό ώστε να πούμε ότι οποίο κύτταρο φέρει το μόριο-στόχο θανατώνεται, καθώς η έκφραση του αντίστοιχου μορίου και η πυκνότητα του στην επιφάνεια του κυττάρου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση του από το CAR T cell, στην σύνδεσή του με αυτό και τον επερχόμενο κυτταρικό θάνατο (Caruso, Heimberger, & Cooper, 2019; Leko & Rosenberg, 2020). Και από την πλευρά τους βέβαια, οι παράμετροι που έχουν ληφθεί υπ' όψιν για την δημιουργία του ιδίου του CAR T λεμφοκυττάρου, όπως θα δούμε εκτενέστερα παρακάτω, επιδρούν στην αναγνώριση, σύνδεση και αποτελεσματικότητα (Jayaraman et al., 2020). Μεγάλη προσοχή απαιτείται στην επιλογή του κατάλληλου TAA στόχου, ειδικά όταν το μόριο αυτό εκφράζεται και στον υγιή ιστό. Η ύπαρξη των Tumor-specific Antigens (TSAs) αποτελεί το βέλτιστο σενάριο στην επιλογή κατάλληλου στόχου των CAR T cells, δηλαδή ενός μορίου που να εκφράζεται αποκλειστικά και μόνο στα καρκινικά κύτταρα του όγκου και όχι στον γύρω υγιή ιστό, με αποτέλεσμα τα CAR T cells να αναγνωρίζουν μόνο τα καρκινικά κύτταρα αφήνοντας άθικτο το υπόλοιπο μέρος του ιστού. Κάτι τέτοιο όμως είναι ιδιαίτερα σπάνιο να συμβεί, αλλά η εύρεση και στόχευση του λύνει πολλά προβλήματα, καθώς είναι δύσκολο να θυσιάσει κανείς κύτταρα υγιούς ιστού ως παράπλευρες απώλειες στην προσπάθεια εξάλειψης του όγκου, ειδικά όταν πρόκειται για κάποιον στερεό όγκο, περιορίζοντας παράλληλα την εφαρμογή της χρήσης των CAR T cells (C. C. Smith et al., 2019).

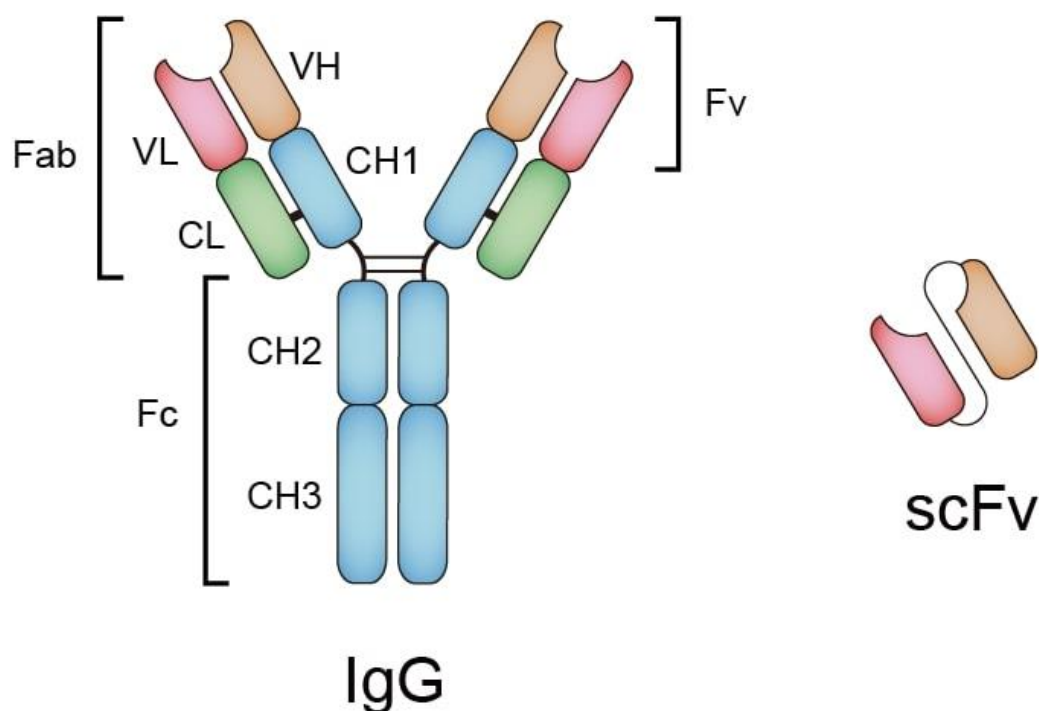
Ένας από τους πιο καλά μελετημένους και ευρείας χρήσης σε κλινικές δοκιμές με CAR T cells στόχους, αποτελεί το CD19 μόριο (Globerson Levin, Rivière, Eshhar, & Sadelain, 2021). Η έκφραση του CD19 μορίου κυτταρικής επιφανείας περιορίζεται μόνο σε κύτταρα της B-κυτταρικής σειράς, B cell lineage, και σε follicular dendritic cells (FDCs). Η έκφραση του CD19 συνοδεύει τα B λεμφοκύτταρα από τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης και ωρίμανσής τους, από το pro-B cell στάδιο μέχρι και την τελική διαφοροποίηση τους σε πλασματοκύτταρα, αποτελώντας με αυτόν τον τρόπο



χαρακτηριστικό δείκτη της γενιάς των B λεμφοκυττάρων (Wang, Wei, & Liu, 2012). Το CD19 έχει χρησιμοποιηθεί ως στόχος σε αρκετές θεραπευτικές προσεγγίσεις για κακοήθειες αίματος με εξαιρετικά αποτελέσματα σε αρκετές περιπτώσεις, με ποσοστά ολικής ύφεση μέχρι και 90% (complete remission, CR) για την εξάλειψη οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας B κυττάρων και λεμφωμάτων καθώς η έκφραση του χαρακτηρίζεται από ομοιογένεια στα B κύτταρα και κατά τις κακοήθειες αυτές. Εξ αλλού, οι πρώτες εγκεκριμένες θεραπείες με CAR T cells για λευχαιμίες και λεμφώματα, είχαν ως στόχο αυτό το μόριο στην κυτταρική επιφάνεια των B λεμφοκυττάρων (Hirayama et al., 2019; Maude et al., 2014). Εκτός από το CD19, μόρια όπως το CD20 και CD22 έχουν χρησιμοποιηθεί για την μελέτη και έρευνα για τις παραπάνω αιματολογικές κακοήθειες και προσπάθειες έχουν γίνει για την στόχευση περισσότερων από ένα μορίων ταυτόχρονα, με σκοπό την βελτίωση της αποτελεσματικότητας των CAR T cells και την αποφυγή ανεπιθύμητων προβλημάτων όπως αυτό της αντιγονικής διαφυγής (antigen escape) (Riaz et al., 2017; Tong et al., 2020).

### scFv

Το χαρακτηριστικό κομμάτι του εξωκυττάρου τμήματος των περισσότερων CAR T cells είναι το scFv (single chain variable fragment) αποτελώντας το σύνθηρες μέσο αναγνώρισης και σύνδεσης των CAR T cells με τον συνδέτη (Benmebarek et al., 2019). Τα scFvs είναι ανασυνδυασμένες τεχνητές πολυπεπτιδικές κατασκευές που αποτελούνται από τις μεταβλητές περιοχές βαριών ( $V_H$ ) και ελαφρών αλυσίδων ( $V_L$ ) ανοσοσφαιρίνης, συνδεδεμένες με ένα εύκαμπτο ολιγοπεπτιδίο-συνδετήρα (linker), με τρόπο ώστε να διατηρούν τις αντιγονοειδικές ιδιότητες των μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAbs) από τα οποία προέρχονται. Η σύνδεση των μεταβλητών περιοχών μεταξύ του  $V_H$  καρβοξυτελικού άκρου και του  $V_L$  αμινοτελικού άκρου με το ολιγοπεπτιδίο δίνει υπόσταση στην τεχνητή δομή του scFv, κρατώντας τις ιδιότητες των αλυσίδων προέλευσης του, ειδικά όταν το αντιγόνο στόχος των μονοκλωνικών αντισωμάτων από τα οποία προέρχεται το scFv είναι μεγάλου μοριακού βάρους. Οι ενδείξεις για τα μόρια-στόχους χαμηλού μοριακού βάρους και διατήρηση των ιδιοτήτων του αντισώματος στο αντίστοιχο scFv ποικίλουν (Ahmad et al., 2012; Bemani, Mohammadi, & Hakakian, 2018). Το πεπτιδίο linker διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του scFv και των ιδιοτήτων του. Το κατάλληλο μήκος στον linker ανάμεσα στις μεταβλητές περιοχές του scFv προσδίδει σωστή αναδίπλωση και σύνδεση με το αντιγόνο ανάλογα με την ειδικότητα ως προς τον στόχο. Ένα μέγεθος linker πεπτιδίου της τάξης των 15 αμινοξέων γλυκίνης και σερίνης με αλληλουχία (GGGS)<sub>3</sub> φαίνεται να έχει τα καλύτερα αποτελέσματα σχετικά με την λειτουργία του scFv στην ευκαμψία και αναδίπλωση των  $V_H$  και  $V_L$ , δίνοντας του παράλληλα σταθερότητα στην δέσμευση του αντιγόνου. Το είδος προέλευσης του scFv, όπως θα δούμε, έχει σημαντικά αποτελέσματα στην αποτελεσματικότητα των CAR T cells εναντίον των κυττάρων στόχων, στην κυτταρολυτική τους δράση, αναγνώριση, έκφραση και σταθερότητα των CARs (Gu et al., 2010; Shan, Press, Tsu, Hayden, & Ledbetter, 1999; Z. Shen, Yan, Zhang, Mernaugh, & Zeng, 2008; Yusakul, Sakamoto, Pongkitwitoon, Tanaka, & Morimoto, 2016).



**Εικόνα 3:** Σχηματική απεικόνιση Ανοσοσφαιρίνης G και scFv ( $V_L$ -πεπτιδίο- $V_H$ ) ([https://www.creativebiolabs.net/scfv-fragment-antibodies\\_25.htm](https://www.creativebiolabs.net/scfv-fragment-antibodies_25.htm))

**Ο ρόλος της συγγένειας (affinity) και της ισχύος πρόσδεσης (avidity) του χημειρικού υποδοχέα στο κύτταρο-στόχο**

### Affinity

Η δύναμη σύνδεσης του scFv με τον αντίστοιχο συνδέτη του -συγγένεια- (affinity: αφορά μεμονωμένα έναν υποδοχέα) αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα θέματα συζήτησης στον χώρο των CAR T cells και μεγάλη σημασία δίνεται σε αυτό το κομμάτι με ποικίλα αποτελέσματα. Πρόκειται ουσιαστικά για την μέτρηση της δύναμης σύνδεσης μεταξύ ενός βιομορίου και του αντίστοιχου συνδέτη του, και στην συγκεκριμένη περίπτωση των CAR T cells, η δύναμη σύνδεσης του CAR υποδοχέα με το μόριο στόχο. Γενικά, η συγγένεια έχει άμεση σχέση και είναι αντιστρόφως ανάλογη με την σταθερά διάστασης  $K_D$  (dissociation constant) η οποία χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση της δύναμης μοριακών αλληλεπιδράσεων. Μεγαλύτερη τιμή  $K_D$  αντιστοιχεί σε μικρότερο affinity ενώ μικρότερη  $K_D$  σε μεγαλύτερο scFv affinity. Η μέτρηση του  $K_D$  δίνεται με τον τύπο  $K_D = k_{off}/k_{on}$  όπου  $k_{off}$ = dissociation rate constant, ρυθμός διάστασης και  $k_{on}$ = association rate constant, ρυθμός σύνδεσης. Το εύρος τιμών του  $K_D$  κυμαίνεται συνήθως σε  $\mu M$  επίπεδα (1-100  $\mu M$ ) αν και μπορεί να βρίσκεται και σε χαμηλότερες τιμές (nM) προσδίδοντας μεγαλύτερη συγγένεια στον αντίστοιχο μηχανισμό σύνδεσης (Campillo-Davo, Flumens, & Lion, 2020). Η συγγένεια αποτελεί έναν κύριο παράγοντα στην επιλογή του κατάλληλου scFv για την χρήση στην δομή του αντίστοιχου CAR. Η σύνδεση πρέπει να είναι ικανοποιητική σε τέτοιο βαθμό ώστε να επιτρέπει την αποτελεσματική αναγνώριση του στόχου, την σωστή αλληλεπίδραση μεταξύ CAR και κυττάρου-στόχου αλλά και την ορθή σηματοδότηση και ενεργοποίηση του CAR T cell. Όμως, μια ισχυρή δέσμευση αντιγόνου δεν αποτελεί απαραίτητα και δείκτη σωστής λειτουργικότητας και αποτελεσματικότητας των CAR

T λεμφοκυττάρων. Ο συνδυασμός ικανότητας αναγνώρισης, δέσμευσης και σωστής λειτουργίας στα CAR T cells αποτελεί ακόμα και τώρα κρίσιμο θέμα γι' αυτό και η βελτιστοποίηση των μεταβλητών περιοχών στο έκαστο scFv κρίνεται απαραίτητη. Χαμηλότερη συγγένεια φαίνεται να προσδίδει στα CAR T cells περισσότερη ειδικότητα ως προς τον στόχο, βελτιωμένη και εξειδικευμένη αναγνώριση και λιγότερες on-target off-tumor τοξικότητες (Ghorashian et al., 2019; X. Liu et al., 2015).

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε με στόχο το ErbB2/HER2 μόριο, που αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους βιοδείκτες καρκίνου του μαστού και στόχο αρκετών αντικαρκινικών θεραπευτικών προσεγγίσεων, δημιουργήθηκαν anti-ErbB2 scFv CARs με όσο το δυνατόν ίδια μορφολογία αλλά διαφορετικών affinities με εύρος τιμών  $K_D \leq 0.32 \mu\text{M}$ . Οι μικρότερης συγγένειας anti-ErbB2 scFv CARs με  $K_D 0.3 \mu\text{M}$  παρουσίασαν επιλεκτική αναγνώριση και κυτταροτοξικότητα κυττάρων με αυξημένη έκφραση ErbB2, όπως τα καρκινικά κύτταρα σε αντίθεση με τον υγιή ιστό, ενώ μεγαλύτερης συγγένειας CARs με  $K_D < 0.1 \mu\text{M}$  δεν έκαναν διάκριση μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων που εκφράζουν το ίδιο μόριο. Επιπλέον, υψηλότερο affinity οδηγεί σε αυξημένη αλλά και γενικευμένη όπως αναφέρθηκε κυτταρική λύση, όμως τιμές  $K_D < 10^{-8} \text{M}$  δεν οδηγούν σε αυξημένη ενεργοποίηση των CAR T cells (Chmielewski, Hombach, Heuser, Adams, & Abken, 2004). Σε άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε με anti-ErbB2 CARs με τροποποιημένα ως προς την συγγένεια scFvs προερχόμενα από μονοκλωνικό αντίσωμα mAb 4D5, χαμηλότερης συγγένειας anti-ErbB2 4D5 CAR T cells παρουσίασαν αυξημένη απόκριση σε όγκους με αυξημένη ErbB2 έκφραση. Αντίθετα, ελάχιστη, σχεδόν μη μετρήσιμη απόκριση παρουσιάστηκε σε καρκινικά κύτταρα με μικρότερα επίπεδα έκφρασης ErbB2, κάτι που δείχνει την επιλεκτική δράση των μικρότερης συγγένειας CARs εναντίον των μεγαλύτερης έκφρασης του στόχου καρκινικών κυττάρων σε αυτήν την περίπτωση, γεγονός που μπορεί να έχει θετικά αποτελέσματα στον φυσιολογικό ιστό. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, high-affinity CAR T cells είχαν ιδιαίτερα υψηλή απόκριση σε καρκινικά κύτταρα και με υψηλή αλλά και χαμηλή ErbB2 έκφραση. Περαιτέρω αξιολόγηση και σε άλλες κυτταρικές γραμμές έδειξε ότι high affinity CAR T cells παρουσίασαν αυξημένη έκκριση IFN $\gamma$  και IL-2 κατά την σύνδεση τους με τα κύτταρα- στόχους με χαμηλή ErbB2 έκφραση, ενώ low affinity CAR T cells είχαν μεγαλύτερη έκκριση τέτοιων κυτοκινών κατά την απόκριση τους σε κύτταρα που εκφράζουν το ErbB2 μόριο σε υψηλότερα επίπεδα. Τα παραπάνω in vitro ευρήματα συνοδεύσαν τα παρόμοια in vivo αποτελέσματα σε μοντέλα ποντικών που δείχνουν ότι low και high affinity CAR T cells ήταν αποτελεσματικά σε καρκινικά κύτταρα με αυξημένη έκφραση ErbB2, ενώ low affinity CAR T cells δεν είχαν ιδιαίτερη επίδραση σε κύτταρα με φυσιολογική έκφραση του μορίου-στόχου (X. Liu et al., 2015).

Όσον αφορά το Πολλαπλό Μυέλωμα (MM) προκλινικές μελέτες έχουν αναδείξει το CD38 μόριο ως κατάλληλο υποψήφιο TAA το οποίο υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα αυτά. Η έκφραση του όμως βρίσκεται σε μεσαία επίπεδα και σε φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα όπως σε NKs και T λεμφοκύτταρα, αλλά και σε προγονικά T, Double Positive CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> φαινοτύπου κατά την θυμική τους ωρίμανση, όπου και η έκφραση του CD38 είναι υψηλή (Costa, Dalla Palma, & Giuliani, 2019). High affinity anti-CD38 CAR T cells είχαν ισχυρή αντικαρκινική δράση in vitro στα MM κύτταρα με την υπερέκφραση του CD38 αλλά λόγω της έκφρασης του και στα φυσιολογικά

αιμοποιητικά υπήρξαν on target, off-tumor τοξικότητες. Για τον λόγο αυτό, CARs δημιουργήθηκαν με τροποποιημένο scFv από anti-CD38 Abs μικρότερης συγγένειας μέσω τεχνολογίας light-chain exchange, τροποποιώντας με αυτόν τον τρόπο την συγγένεια αλλά όχι την ειδικότητα ως προς τον επίτοπο. Τα low affinity CAR T cells παρουσίασαν πιο εξειδικευμένη αναγνώριση προς τα καρκινικά κύτταρα in vivo και όχι τόσο προς τα φυσιολογικά αιμοποιητικά χαμηλότερης CD38 έκφρασης, περιορίζοντας έτσι τις ανεπιθύμητες τοξικότητες (Drent et al., 2017).

Σε anti-ICAM1 LFA-1 I domain containing CARs που δημιουργήθηκαν με μηχανισμό αναγνώρισης και σύνδεσης το LFA-1, τον φυσικό συνδέτη του ICAM1, με affinities εύρους τιμών  $K_D$  από 1nM έως 1mM, lower affinity CARs ( $K_D \sim 10\mu M$ ) παρουσίασαν υψηλότερο θεραπευτικό δείκτη in vivo σε σχέση με high affinity anti-ICAM1 CARs (1-100nM), χωρίς την εμφάνιση σοβαρών τοξικοτήτων (S. Park et al., 2017). Το ICAM1 υπερεκφράζεται σε καρκινώματα αλλά παρουσιάζει και συστηματική φυσιολογική έκφραση σε ενδοθηλιακά κύτταρα, κύτταρα του ανοσοποιητικού και σε επιθηλιακά, κάτι που οδήγησε τα CAR T cells υψηλής συγγένειας προς αυτό το μόριο σε τοξικότητες των φυσιολογικών κυττάρων, ενώ τα CAR T cells με  $\mu M$  affinity εξάλειψαν xenografts καρκινώματος θυρεοειδούς σε ποντίκια χωρίς off tumor τοξικότητες (S. Park et al., 2017; Vedvyas et al., 2019).

Σε άλλη έρευνα, δημιουργήθηκαν novel anti-CD19 (CAT) CAR T cells, χαμηλότερης συγγένειας από τα FMC63 CARs που χρησιμοποιούνται συνήθως στις κλινικές μελέτες για υποτροπιάζουσα/ανθεκτική Οξεία Λεμβοβλαστική Λευχαιμία B κυττάρων (R/R B-ALL) με στόχο το CD19. Τα αποτελέσματα έδειξαν μεγαλύτερο πολλαπλασιασμό και κυτταροτοξικότητα in vitro στα χαμηλότερης συγγένειας CAT CAR T cells καθώς και περισσότερη αντικαρκινική δράση in vivo (Ghorashian et al., 2019).

### High affinity

Τα πλεονεκτήματα της μικρότερης συγγένειας του CAR προς τον στόχο σχετίζονται με μειωμένη αποτελεσματικότητα ως προς την λύση των κυττάρων στόχων. Υψηλότερη συγγένεια όπως φαίνεται σχετίζεται με εντονότερη αντικαρκινική δράση αλλά μειωμένη εξειδικευμένη κυτταρική αναγνώριση συγκριτικά με τους CARs μικρότερης συγγένειας και περισσότερες ανεπιθύμητες τοξικότητες ειδικά όταν το μόριο στόχος εκφράζεται και στον αντίστοιχο υγιή ιστό (X. Liu et al., 2015).

Anti-FR $\beta$  CAR T cells προερχόμενα από υψηλότερης συγγένειας HA-FR $\beta$  scFv με  $K_D$  2.4nM, παρουσίασαν αρκετά μεγαλύτερη αντίδραση εναντίον FR $\beta^+$  κυττάρων σε Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία (AML), συγκριτικά με χαμηλότερης συγγένειας CARs  $K_D$  54.3nM, τα οποία αποδείχθηκαν αναποτελεσματικά ενάντια στην ασθένεια. Πολύ υψηλότερα επίπεδα IFN $\gamma$  παρουσιάστηκαν στα HA-FR $\beta$  CAR T cells, παρουσία FR $\beta^+$  κυττάρων, αυξημένα επίπεδα IL2 και μέτρια με χαμηλά ποσοστά IL4, IL10 και TNF $\alpha$ . Τα HA-anti-FR $\beta$  CAR T cells παρουσίασαν ταχεία και ολοκληρωτική εξάλειψη της AML in vivo σε μοντέλα ποντικών χωρίς μακροχρόνιες τοξικότητες, ενώ όπως πριν τα LA-CAR T cells δεν ήταν αποτελεσματικά (Lynn et al., 2016).

Το GD2 αποτελεί έναν από τους κύριους υποψηφίους TAAs για το ΚΝΣ καθώς και στόχο θεραπειών μέσω μονοκλωνικών αντισωμάτων (dinutuximab). Η έκφραση του συνοδεύει κυρίως την ανάπτυξη του εγκεφάλου αν και υπάρχει σε μικρότερες

ποσότητες και στον ενήλικο ιστό. Η υπερέκφραση του όμως, σε νευροβλάστωμα, μια από τις συνήθεις αιτίες θανάτου από παιδικό καρκίνο με ποσοστό 15%, μελάνωμα και παιδικό σάρκωμα το καθιστά στόχο προκλινικών μελετών ανοσοθεραπείας (Richards, Sotillo, & Majzner, 2018). Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε με στόχο το GD2 στο παιδιατρικό νευροβλάστωμα, με τροποποίηση, μέσα από αντικατάσταση βάσης, της συγγένειας του GD2-specific scFv που χρησιμοποιήθηκε, παρατηρήθηκε περισσότερη αντικαρκινική δράση ενάντια στον όγκο. Μέσω point mutation E101K, παρατηρήθηκε αυξημένη affinity στο GD2-specific scFv που χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία των anti-GD2 CAR T cells, που τελικά οδήγησε σε βελτιωμένη αντικαρκινική δράση *in vitro* και *in vivo* σε μοντέλα ποντικών. Παρά την βελτιωμένη δράση κατά του όγκου, εννέα μέρες μετά την έγχυση των E101K anti-GD2 CAR T cells, παρουσιάστηκαν σοβαρές νευροτοξικότητες του ΚΝΣ σε όλα τα ποντίκια που δέχθηκαν τα υψηλότερης συγγένειας CAR T cells με αποτέλεσμα θανατηφόρες εγκεφαλοπάθειες. Τα παραπάνω μαρτυρούν την σημαντικότητα της παραμέτρου της συγγένειας και την αναγκαιότητα τροποποίησης και ύπαρξης ισορροπίας ανάμεσα σε εξειδικευμένη κυτταρική αναγνώριση και αντικαρκινική δράση (Richman et al., 2018).

Το CD123 εκφράζεται σε μεγάλες ποσότητες σε όγκους του αίματος όπως στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (Mardiros, Forman, & Budde, 2015). Σε CAR T cells με στόχο το CD123, μέσα από αντικατάσταση βάσεων δημιουργήθηκαν CAR mutants χαμηλότερων affinities από το WT. Διατηρώντας σταθερό τον ρυθμό αποσύνδεσης  $k_{off}$  και κάνοντας πιο αργό τον ρυθμό σύνδεσης  $k_{on}$ , δημιουργήθηκαν CARs μικρότερων affinities από το WT, ακόμα και 10 με 100 φορές μικρότερο σε δυο περιπτώσεις, διατηρώντας σταθερή βέβαια την περιοχή σύνδεσης με τον επίτοπο. Σκοπός της ερευνάς ήταν η ανάδειξη του ρόλου και της συσχέτισης των παραμέτρων της συγγένειας, έκφρασης και πυκνότητας του TAA στα κύτταρα στόχο και της έκφρασης του CAR στα τροποποιημένα T λεμφοκύτταρα. Όπως και στις προηγούμενες μελέτες, οι μικρότερης συγγένειας CARs αναγνώρισαν και παρουσίασαν κυτταρολυτική δράση εναντίον AML CD123<sup>+</sup> κυττάρων με αυξημένη CD123 έκφραση ενώ δεν ήταν ιδιαίτερα δραστικά εναντίον κυττάρων με φυσιολογική/χαμηλότερη έκφραση, υποστηρίζοντας την συσχέτιση της χαμηλότερης συγγένειας με την αναγνώριση κυττάρων με υψηλότερη όμως έκφραση του στόχου και την μείωση των on target, off tumor τοξικοτήτων. Παρά την άμεση κυτταρική λύση, η μακροχρόνια επίδραση των CAR T cells στα κύτταρα στόχους παρουσιάστηκε ίδια για όλα τα T κύτταρα, παρά το γεγονός ότι έφεραν διαφορετικών affinities CARs. Η παράμετρος όμως που φαίνεται να επηρέασε τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή IFN $\gamma$ , IL-2 και άλλων κυτοκινών, είναι τα επίπεδα έκφρασης των CARs ανεξαρτήτως συγγένειας ως προς τα CD123<sup>+</sup> κύτταρα. Γεννάται έτσι ο ισχυρισμός της άρρηκτης συσχέτισης της κυτταρικής επίδρασης των CAR T cells σε αργότερα στάδια, με την κατάλληλα επίπεδα έκφρασης των CAR υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια των τροποποιημένων T. Συγκεκριμένα, high affinity anti-CD123 CAR T cells ( $K_D=2nM$ ) με χαμηλή CAR έκφραση παρουσίασαν αρκετά χαμηλότερα επίπεδα παραγωγής κυτοκινών και πολλαπλασιασμού, παρά την όμοια κυτταρολυτική τους δράση, σε σχέση με high affinity (1nM) anti-CD123 CAR T cells με υψηλότερη CAR έκφραση, παρουσιάζοντας έτσι την σημαντικότητα της παραμέτρου της έκφρασης των CAR υποδοχέων στην επιφάνεια των T κυττάρων όταν οι τιμές της συγγένειας είναι συγκρίσιμες (Arcangeli et al., 2017). Όπως φαίνεται και υποστηρίζεται και με τα προηγούμενα αποτελέσματα,

ισχυρότερη συγγένεια πέρα από ένα συγκεκριμένο όριο δεν προωθεί αυξημένη ενεργοποίηση ή ενίσχυση της αντικαρκινικής δράσης των CAR T cells (Chmielewski et al., 2004)

### **Ισχύς πρόσδεσης (Avidity)**

Ο όρος affinity όπως αναφέρθηκε αφορά μεμονωμένα την ισχύ της σύνδεσης ενός CAR υποδοχέα με το αντίστοιχο μόριο στόχο. Ο όρος avidity όμως αφορά την ισχύ πρόσδεσης ως προς το σύνολο των CARs στην κυτταρική επιφάνεια του CAR T cell με το αντίστοιχο μόριο και αποτελεί δείκτη μέτρησης της συγγένειας του συνόλου των υποδοχέων. Εξαρτάται από την έκφραση και πυκνότητα του αντιγόνου στα κύτταρα στόχους, τα επίπεδα έκφρασης των CARs και την μεμονωμένη affinity καθενός χημιακού υποδοχέα. Επιπλέον ένας άλλος αξιοσημείωτος παράγοντας είναι η λειτουργική συγγένεια (functional avidity), που στα φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα έχει άμεση σχέση με την συγκέντρωση αντιγόνου στις TCR/pMHC συνδέσεις για την ενεργοποίηση ενός T κυττάρου *in vitro*. Σε high functional avidity T λεμφοκύτταρα παρατηρείται απόκριση σε μικρές ποσότητες αντιγόνου *in vitro*, ενώ lower functional avidity T κύτταρα απαιτούν μεγαλύτερες ποσότητες Ag για την πυροδότηση απόκρισης. Αν και στα CAR T cells δεν υπάρχει αρκετή γνώση πάνω σε αυτό το θέμα όπως στα φυσιολογικά T, δεν παύει να αποτελεί σημαντικό παράγοντα επίδρασης στην συνολική λειτουργικότητα τους (Campillo-Davo et al., 2020; Greenman et al., 2021).

Για την αποσαφήνιση της επίδρασης των παραμέτρων affinity, avidity, και TAA πυκνότητας στην functional avidity, την απόκριση δηλαδή (κυτταρολυτική δράση, παραγωγή κυτοκινών) και αποτελεσματικότητα των CAR T cells παρουσία των κυττάρων στόχων, κατασκευάστηκαν scFv-based διαφορετικών affinities CARs με στόχο το Tyr/HLA-A2 TAA μελανώματος (εύρος τιμών  $K_D$  4-400nM) (Michaeli, Sinik, Haus-Cohen, & Reiter, 2012). Το Tyr<sub>369-377</sub> πεπτίδιο τυροσινάσης παρουσιάζεται κατά μεγάλο βαθμό από HLA-A2 μόρια σε καρκινικά κύτταρα μελανώματος και το pHLA σύμπλεγμα HLA-A2-Tyr χρησιμοποιείται ως υποψήφιος TAA στόχος (Lotz et al., 2004; Michaeli et al., 2012). Τα CAR T cells διαχωρίστηκαν στην συνέχεια με βάση το avidity και τα επίπεδα της CAR έκφρασης σε high, medium και low αντιστοίχως. Εν συνέχεια τα CAR T cells ήρθαν αντιμέτωπα με κύτταρα-στόχους, *in vitro* και *in vivo* σε xenografts μελανώματος ποντικών, με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του αντιγόνου και μελετήθηκαν ως προς την επίδραση των παραπάνω παραμέτρων στην αποτελεσματικότητά τους. Οι μελέτες, όπως είναι λογικό, έδειξαν άμεση συσχέτιση μεταξύ avidity και επίπεδα CAR έκφρασης στην κυτταρική επιφάνεια των τροποποιημένων T κυττάρων. Επιπλέον, αυξημένη avidity φαίνεται να προωθεί ισχυρότερες αποκρίσεις παρουσία των κυττάρων στόχων, παρέχοντας στα CAR T cells αυξημένη «ευαισθησία» ως προς το αντιγόνο άρα και ισχυρότερες αποκρίσεις σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις του αντιγόνου στόχου. High avidity CAR T cells παρουσίασαν ένα πιο ευρύ φάσμα Ag συγκέντρωσης που είναι ικανό να πυροδοτήσει μια maximum απόκριση. Medium avidity CAR T cells παρουσιάστηκαν περισσότερο πολυλειτουργικά ως προς την κυτταρολυτική τους δράση, πολλαπλασιασμό και έκκριση IL-2, IFN $\gamma$  και TNF $\alpha$  ταυτοχρόνως. Η πολυλειτουργικότητα, η χαρακτηριστική ικανότητα δηλαδή επαγωγής πολλών λειτουργιών ταυτόχρονα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης της λειτουργίας και τοξικότητας των CAR T cells. Η ευαισθησία των CAR T cells ως προς το αντιγόνο φαίνεται να εξαρτάται από τα επίπεδα

έκφρασης των CARs ενώ η ειδικότητα τους επηρεάζεται από την affinity καθώς και τα επίπεδα της CAR έκφρασης. Υψηλότερα επίπεδα έκφρασης οδηγούν σε ισχυρότερες αποκρίσεις σε μη-ειδικούς στόχους και σύμφωνα και με προηγούμενες μελέτες ισχυρή συγγένεια αυξάνει το ρίσκο για on target, off tumor τοξικότητες. Σύμφωνα με τις ενδείξεις, τα high affinity (4nM) CAR T cells δεν παρουσίασαν ιδιαίτερα αυξημένη δράση εναντίον των κυττάρων στόχων ενισχύοντας ακόμα περισσότερο τον ισχυρισμό ύπαρξης ενός affinity threshold που τιμές μεγαλύτερης συγγένειας δεν οδηγούν σε ενίσχυση της δράσης των CAR T cells. Αντίθετα, medium affinity (35nM) CAR T cells παρουσίασαν την υψηλότερη δράση εναντίον κυττάρων χαμηλής έκφρασης του αντιγόνου στόχου. Τα παραπάνω μαρτυρούν την αναγκαιότητα τροποποίησης, ρύθμισης και ύπαρξης ισορροπίας μεταξύ των παραμέτρων κατά την κατασκευή του βέλτιστου CAR για την κατάλληλη αντιγονική αναγνώριση, απόκριση, λειτουργικότητα και μείωση των ανεπιθύμητων τοξικοτήτων (Michaeli et al., 2012).

### **Τοπολογία του επίτοπου στόχου**

Η τοπολογία του επίτοπου, η απόσταση δηλαδή του επίτοπου του αντιγόνου από την μεμβράνη του κυττάρου στόχου, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην λειτουργικότητα των CAR T cells καθώς μπορεί να επηρεάσει καθοριστικά τον σχηματισμό ανοσολογικής σύναψης άρα και κυτταρολυτική δράση των τροποποιημένων T κυττάρων, την σηματοδότηση τους και την επακόλουθη έκκριση κυτοκινών (Benmebarek et al., 2019; Xiong et al., 2018). Η μεσοθηλίνη (MSLN) αποτελεί έναν από τους πιο κατάλληλους TAAs καθώς η έκφραση του βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα σε φυσιολογικούς ιστούς. Η αυξημένη έκφραση του όμως σε αρκετούς στερεούς όγκους όπως παγκρέατος, πνεύμονα και μεσοθηλίωμα, το καθιστά προφανή στόχο αρκετών μελετών ανοσοθεραπείας (Morello, Sadelain, & Adusumilli, 2016). Η εξωκυτταρική περιοχή του MSLN μορίου διαχωρίζεται σε 3 regions, με το membrane-distal region (region I) να αποτελεί τον στόχο των περισσότερων ανοσοθεραπειών. Ενώ οι αρχικές μελέτες έχουν δείξει ότι η στόχευση της συγκεκριμένης περιοχής του MSLN μορίου μπορεί να περιορίσει και να μπλοκάρει την αύξηση του όγκου in vitro, τα αντίστοιχα in vivo αποτελέσματα φανερώνουν χαμηλή αποτελεσματικότητα ενάντια στον όγκο και θεωρείται ότι αυτό προκαλείται από τις αλληλεπιδράσεις του membrane-distal region επίτοπου με πρωτεϊνικά μόρια όπως το MUC16, περιορίζοντας έτσι την αντικαρκινική δράση των CAR T cells με στόχο τον συγκεκριμένο επίτοπο. Για την άμεση σύγκριση της επίδρασης της απόστασης επίτοπου από την μεμβράνη των κυττάρων στόχων δημιουργήθηκαν meso1 και meso3 CAR T cells με στόχους τον membrane-distal επίτοπο και τον membrane-proximal region επίτοπο αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα in vitro έδειξαν μεγαλύτερη κυτταρολυτική δράση και παραγωγή κυτοκινών υπέρ των meso3 CAR T cells που στόχευαν τον μικρότερης απόστασης από την μεμβράνη επίτοπο, παρουσία MSLN<sup>+</sup> καρκινικών κυττάρων. Παρόμοια φάνηκαν και τα αποτελέσματα in vivo σε HGC-27 xenografts σε μοντέλα ποντικών, όπου έδειξαν πλήρη εξάλειψη του όγκου από τα meso3 CAR T cells σε αντίθεση με τα meso1, τα οποία ναι μεν επηρέασαν αλλά δεν εξαφάνισαν τα MSLN<sup>+</sup> γαστρικά καρκινικά κύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η δράση των meso3 CAR T cells δεν παρουσίασε τοξικότητες στον φυσιολογικό ιστό. Σε καρκίνο των ωοθηκών, τα meso3 CAR T cells εξάλειψαν τους περισσότερους όγκους στα αρχικά τους στάδια. Παράλληλα, παρουσίασαν αναστολή της ανάπτυξης όγκων μεγάλου ήδη μεγέθους

καθώς και αυξημένο χρόνο επιβίωσης των ποντικών. Με βάση τα παραπάνω φαίνεται πως ο membrane-proximal region επίτοπος του μορίου μεσοθηλίνης να αποτελεί έναν πιο κατάλληλο στόχο αντικαρκινικής θεραπείας (Z. Zhang et al., 2019).

Σε άλλη έρευνα με anti-CD22 CAR T cells που στόχευαν διαφορετικούς επίτοπους του CD22 σε αιματολογικές κακοήθειες B κυττάρων, η maximum κυτταρολυτική δράση των CAR T cells φάνηκε να μειώνεται με την αύξηση της απόστασης του επίτοπου από την μεμβράνη των CD22<sup>+</sup> κυττάρων στόχων, υποστηρίζοντας την παράμετρο της τοποθεσίας εύρεσης του επίτοπου και της απόστασης του από την κυτταρική μεμβράνη στην λειτουργικότητα των CAR T cells. Στα anti-CD22 CAR T cells που στόχευαν membrane-distal επίτοπους παρατηρήθηκε μειωμένη αποκοκκίωση και στοχευμένη κυτταρολυτική δράση γεγονός που εικάζεται ότι έχει σχέση με την επίδραση της απόστασης του επίτοπου από την κυτταρική μεμβράνη στην ανοσολογική σύναψη και την μείωση φωσφορυλίωσης των CD3ζ αλυσίδων, με αποτέλεσμα την μειωμένη ενδοκυτταρική σηματοδότηση μετά την σύνδεση με τους συγκεκριμένους επίτοπους του CD22 μορίου (Benmebarek et al., 2019; James et al., 2008; Xiong et al., 2018).

## Άλλοι εξωκυττάριοι μηχανισμοί αναγνώρισης

### Fab-based CARs

Η δεσμευτική ικανότητα ορισμένων scFvs δεν είναι κατάλληλη για την κατασκευή CARs. Επιπλέον, η έλλειψη σταθερότητας περιορίζει ακόμα περισσότερο την αποτελεσματικότητα των CAR T cells καθώς τα scFvs παρουσιάζουν την τάση να δημιουργούν συσσωματώματα στην κυτταρική επιφάνεια, γεγονός που έχει άμεση σχέση με την λανθασμένη αναδίπλωση των V<sub>H</sub> και V<sub>L</sub> τμημάτων. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα έκφρασης των CAR υποδοχέων, ιδίως όταν η Ag πυκνότητα απαιτεί υψηλή CAR έκφραση, καθώς και ένα ακατάλληλο πεπτιδίο linker που θα χρησιμοποιηθεί για την σύνδεση των μεταβλητών περιοχών, συντελούν στο παραπάνω πρόβλημα. Η δημιουργία συσσωματωμάτων αυξάνει το ρίσκο για λανθασμένο ταίριασμα των μεταβλητών περιοχών που παίρνουν μέρος στην ορθή λειτουργία του scFv με άμεσο αποτέλεσμα στην λειτουργικότητα και επιβίωση των CAR T cells, καθώς μπορεί να αυξήσουν το τονικό σήμα που υπάρχει ενδογενώς στα T λεμφοκύτταρα, κάτι που όπως θα δούμε αναλυτικά στην ενδοκυτταρική περιοχή των CAR T cells, μπορεί να είναι καταστροφικό στην λειτουργία τους (Gil & Schrum, 2013; Harris & Kranz, 2016; Wörn & Plückthun, 1999). Για την αντιμετώπιση των παραπάνω δυσκολιών, έχουν μελετηθεί προσπάθειες κατασκευής συνθετικών υποδοχέων με εξωκυττάριο μηχανισμό αναγνώρισης από Fab τμήμα ανοσοσφαιρίνης, τις μεταβλητές V<sub>H</sub> και V<sub>L</sub> περιοχές δηλαδή όπως είδαμε στο scFv, αλλά και τις πρώτες σταθερές περιοχές βαριών και σταθερές ελαφριών αλυσίδων. Μέσα από χρήση των Fab περιοχών ανοσοσφαιρίνης σε συνδυασμό με τις σταθερές περιοχές α και β αλυσίδων του φυσιολογικού TCR, κατασκευάστηκε ένας τέτοιος Fab-based συνθετικός υποδοχέας, με γενικό πρότυπο V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>α</sub> και V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>-C<sub>β</sub> να αντιπροσωπεύει τις αλυσίδες του συγκεκριμένου CAR. Η κυτταρομετρία ροής έδειξε επιτυχημένη έκφραση των anti-CD276 Fab-CARs μετά την μεταφορά του CAR διαγονιδίου στα T λεμφοκύτταρα και τα αποτελέσματα με στόχο καρκίνο του θυρεοειδούς έδειξαν ορθή αναγνώριση, εξάλειψη του όγκου in vitro και ικανοποιητική έκκριση IL-2 και IFN $\gamma$  συγκριτικά με τα control T λεμφοκύτταρα,



όπου και η έκκριση των αντιστοίχων κυτοκινών ήταν ελάχιστη (Duan, Huang, & Jing, 2019).

### **Nanobodies**

Τα nanobodies έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται εκτενώς στον χώρο της ανοσοθεραπείας, ως μηχανισμοί αναγνώρισης στόχου στην εξωκυτταρική περιοχή των CAR T cells, ειδικά στην αντιμετώπιση στερεών όγκων (Xie et al., 2019). Λόγω της σταθερότητας και του μικρού τους μεγέθους παρέχουν πρόσβαση σε διαφορετικούς επίτοπους από τα κλασικά scFvs, ξεκλειδώνοντας έτσι την έρευνα πάνω στο κομμάτι στόχευσης του κατάλληλου αντιγόνου. Με σχετικά συγκρίσιμες συγγένειες με τα scFvs αποτελούν μια καλή εναλλακτική ως μηχανισμό αναγνώρισης. Προέρχονται από τις μεταβλητές V<sub>H</sub> περιοχές αντισώματος αποτελούμενο μόνο από βαριές αλυσίδες από καμηλίδες. Τα nanobodies/VHH παρέχουν το πλεονέκτημα της χαρακτηριστικής τους σταθερότητας καθώς αποτελούνται από single domains βαριών αλυσίδων, αποφεύγοντας έτσι την λανθασμένη αναδίπλωση, mispairing των μεταβλητών περιοχών και σχηματισμό συσσωματωμάτων, πρόβλημα που παρουσιάζεται στην κυτταρική επιφάνεια των scFv-based CAR T cells με ανεπιθύμητα αποτελέσματα στην λειτουργικότητα τους (Bever et al., 2016). Με VHH-based CAR T cells με στόχο το PD-L1 checkpoint inhibitor που υπερεκφράζεται σε αρκετούς τύπους καρκίνου, και το E1B domain φιμπρονεκτίνης που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε όγκους και κατά την αγγειογένεση, προσπάθησαν να αναστείλουν τις ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες του στρώματος στο μικροπεριβάλλον στερεών όγκων. Τα CAR T cells αναγνώρισαν τους στόχους και παρουσίασαν αντικαρκινική δράση αναστέλλοντας την ανάπτυξη των όγκων σε κυτταρικές σειρές MC38 αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου και B16 μελανώματος με υψηλή έκφραση των μορίων στόχων (Xie et al., 2019). Σε άλλη έρευνα, παρουσιάστηκαν αποτελέσματα μελέτης ταυτόχρονης στόχευσης δυο TAAs από nanobody-based διειδικούς/dual CARs. Στόχοι ήταν τα CD20 και HER2 μόρια και κατασκευάστηκαν anti-CD20-specific nanoCARs, anti-HER2 nanoCARs καθώς και CD20/HER2 dual nanoCARs. Η δράση των παραπάνω CAR T cells ως προς την λυτική τους ικανότητα και παραγωγή κυτοκινών δοκιμάστηκε σε HER2<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> και HER2<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> Jurkat κύτταρα. Γενικά η έκφραση των nanoCARs ήταν σε υψηλότερα επίπεδα από την έκφραση των αντιστοίχων CARs scFv προέλευσης και ειδικά των dual CARs ήταν σταθερή και σε υψηλό ποσοστό έκφρασης. Η κυτταρολυτική δράση και παραγωγή IL-2, IFN $\gamma$  και TNF $\alpha$  ήταν μεγαλύτερη στα dual nanoCAR T cells παρουσία HER2<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> κυττάρων απ' ό,τι σε αυτά που στόχευαν μονομερώς το HER2 σε HER2<sup>+</sup> μόνο κύτταρα. Όμως, η δράση των dual CAR T cells ήταν λίγο μικρότερη σε σχέση με αυτή των anti-CD20-specific σε CD20<sup>+</sup> κύτταρα. Παρ' όλα αυτά, φάνηκε η χρησιμότητα των nanobodies/VHH ως επιτυχείς μηχανισμοί αναγνώρισης των μορίων στόχων και μια εναλλακτική λύση όταν η πολυπλοκότητα των scFvs αποφέρει προβλήματα στην λειτουργικότητα των CAR T cells (De Munter et al., 2018).

### **Spacer/ Hinge domain (HD)**

Ο μηχανισμός αναγνώρισης και δέσμευσης στόχου της εξωκυτταρικής περιοχής (κυρίως scFv) συνδέεται με την διαμεμβρανική περιοχή μέσω ενός spacer τμήματος γνωστό και ως hinge domain (HD). Αυτό επιτυγχάνεται συνήθως με την χρήση ενός απλού hinge region ανοσοσφαιρίνης, δηλαδή μια μικρή εύκαμπτη αλληλουχία

αμινοξέων που αποτελεί το ενδιάμεσο κομμάτι σύνδεσης μεταξύ των Fab και Fc περιοχών ενός αντισώματος. Στα περισσότερα CAR T cells έχει χρησιμοποιηθεί για αυτό τον σκοπό το hinge-CH2CH3 υποκατηγορίας ανοσοσφαιρίνων IgG1 (IgG1-Fc) που αποτελούν και την πιο άφθονη ποσότητα ανοσοσφαιρίνης στον ορό του αίματος στον άνθρωπο. Αλληλουχίες αμινοξέων και από άλλα μόρια όπως CD8, CD28 και IgG4 έχουν χρησιμοποιηθεί ως spacer εκτός από το IgG1 προέλευσης hinge-CH2CH3 με διαφορετικά αποτελέσματα αναδεικνύοντας την σημασία της σύστασης του συνδετικού αυτού τμήματος που πρέπει να παρέχει την κατάλληλη ευελιξία, λειτουργικότητα και σταθερότητα στην περιοχή δέσμευσης αντιγόνου, γεφυρώνοντας την παράλληλα με την διαμεμβρανική περιοχή του CAR (Jayaraman et al., 2020; Watanabe et al., 2016).

Έχει δειχθεί ότι το μήκος και η αλληλουχία του spacer επηρεάζει την ικανότητα δέσμευσης του αντιγόνου και στην περαιτέρω σηματοδότηση του CAR T cell άρα και την αποτελεσματικότητα στην θεραπευτική προσέγγιση καθώς και στην πρόσβαση του CAR σε membrane proximal/distal επίπεδους του κυττάρου στόχου (Watanabe et al., 2016). Σε έρευνα που διεξήχθη με στόχο ROR1<sup>+</sup> κύτταρα σε χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία B κυττάρων (B-CLL), λέμφωμα μανδύα (MCL) και επιθηλιακών τύπου καρκίνου, διαφαίνεται η σημαντικότητα των παραμέτρων μεγέθους spacer και επιλογής κατάλληλου scFv για την αναγνώριση και στόχευση του αντίστοιχου TAA (Hudecek et al., 2013). Το ROR1 είναι ένα μόριο που εκφράζεται σε αρκετούς ιστούς κατά την εμβρυογένεση, καθώς και σε αρκετούς τύπους καρκίνου όπως κακοήθειες B κυττάρων σαν την CLL, λέμφωμα μανδύα (mantle cell lymphoma), επιθηλιακού ιστού, καρκίνος ωοθηκών, καρκίνος ενδομητρίου, καρκίνος του πνεύμονα και του μαστού. Βέβαια, σε ενήλικους ιστούς η έκφρασή του είναι περιορισμένη. Η ROR1 έκφραση ποικίλει ανάμεσα στους ασθενείς, με έναν μεγάλο βαθμό ετερογένειας και η έκφρασή του παρουσιάζεται σχετικά σταθερή σε κάθε άτομο μεμονωμένα μέσα στην πάροδο του χρόνου, χωρίς ιδιαίτερα αξιόλογες αποκλίσεις. Παρ' όλα αυτά, αυξημένη ROR1 έκφραση πιθανόν να σχετίζεται με πιο επιθετική μορφή και προχωρημένη εξέλιξη της CLL σε ασθενείς. ROR1<sup>+</sup> CLL κύτταρα παρουσιάζουν καλύτερη επιβίωση, πολλαπλασιασμό και μετανάστευση σε αντίθεση με τα αντίστοιχα ROR1<sup>-</sup> CLL κύτταρα, πιθανόν λόγω της ανικανότητας των τελευταίων να αντιδρούν σε ενδογενή Wnt5a. Το ROR1 αποτελεί υποδοχέα του Wnt5a που προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιβίωση όπως φαίνεται και στην περίπτωση του εξωγενούς Wnt5a, με τα ROR1<sup>+</sup> CLL κύτταρα να παρουσιάζουν καλύτερη βιωσιμότητα, μετανάστευση και CXCL12- ή CCL19-καθοδηγούμενο χημειοτακτισμό. Αυξημένη ενεργοποίηση-φωσφορυλίωση Akt παρατηρείται στα ROR1<sup>+</sup> κύτταρα ασθενών με CLL γεγονός που ίσως να σχετίζεται με την ταχύτερη εξέλιξη της ασθένειας. Η περιορισμένη έκφραση του σε φυσιολογικούς ενήλικους ιστούς καθώς και το γεγονός ότι μπορεί να δρα ως υπομόχλιο για την εξέλιξη της CLL και άλλων κακοηθειών καθιστά το ROR1 ως έναν σημαντικό υποψήφιο TAA στόχο αντικαρκινικής θεραπείας όπως συμβαίνει και στην περίπτωση των CAR T cells (Cui et al., 2016; Wallstabe et al., 2019; S. Zhang et al., 2012). Σε έρευνα κατασκευάστηκαν ROR1-specific CARs από scFvs διαφορετικών affinities, με διαφορετικές spacer περιοχές και CD28 ή 4-1BB συνδιεγερτικά μόρια, με σκοπό να μελετήσουν την επίδραση των παραμέτρων αυτών στην ικανότητα αναγνώρισης και εξάλειψης ROR1<sup>+</sup> όγκων. Τα τροποποιημένα T κύτταρα με την μικρότερη "Hinge-only" spacer περιοχή, με scFv από 2A2 mAb,

παρουσίασαν καλύτερη αναγνώριση, πολλαπλασιασμό και λειτουργικότητα *in vitro*. Στην συνέχεια και με σκοπό να δουν την επίδραση του διαφορετικού scFv και της συγγένειας στην αποτελεσματικότητα, δημιούργησαν ROR1 CAR T cells με scFv από R12 mAb, με 50 φορές μεγαλύτερη affinity από τα 2A2 scFvs που είχαν χρησιμοποιήσει. Παρόμοια αποτελέσματα, όπως προηγουμένως, προέκυψαν όσον αφορά το μέγεθος του spacer, με τον μικρότερο spacer να παρέχει την καλύτερη αναγνώριση και λύση των καρκινικών κυττάρων. Όμως, τα T κύτταρα με τους R12 ROR1 CARs παρουσίασαν μεγαλύτερη αντικαρκινική δράση με αρκετά μεγαλύτερη παραγωγή IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  και IL-2 και πολλαπλασιασμό σε σχέση με τα 2A2 CAR T cells. Επιπλέον, μειωμένη συχνότητα κυτταρικού θανάτου επαγόμενου από ενεργοποίηση (activation induced cell death, AICD) παρατηρήθηκε στα R12 CAR T cells συγκριτικά με τα αντίστοιχα 2A2 μέσω PI χρώσης, παρά τις αντίθετες προσδοκίες. Στα τροποποιημένα T κύτταρα η έκφραση των CARs με CD28 συνδιεγερτικό μόριο έναντι του 4-1BB, παρουσίασε μεγαλύτερη παραγωγή των παραπάνω κυτοκινών, περισσότερο πολλαπλασιασμό και μειωμένο AICD (Hudecek et al., 2013).

Άλλα αποτελέσματα δείχνουν την IgG4-προέλευσης HD να παρουσιάζει τα λιγότερο θετικά αποτελέσματα στην αποτελεσματικότητα σε σχέση με CAR T cells με CD8 ή CD28-HD. Παράλληλα, CD28-HD φαίνεται να παρουσιάζει την λιγότερη ευκαμψία σε σχέση με τα υπόλοιπα HD τμήματα (Fujiwara et al., 2020). Άλλη έρευνα επικεντρώθηκε στο πως επηρεάζει το εξωκυττάριο spacer τμήμα τις ιδιότητες σε FMC63 scFv-based CAR T cells με στόχο το CD19. Για τον λόγο αυτόν, κατασκεύασαν δυο ειδών CARs με ίδια διαμεμβρανική και ενδοκυτταρική δομή μορφής CD28 TMD/4-1BB.CD3ζ σηματοδοτική περιοχή και διαφορετικούς spacers με 1) long: IgG4 hinge-CH2-CH3(229 aa) και 2) short: hinge only domain (12 aa). Η διαγονιδιακή κασέτα επιπλέον περιλάμβανε EGFRt για tracking *in vivo*. Τα *in vitro* αποτελέσματα μετά την ιική διαμόλυνση CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> κυττάρων, έδειξαν ότι και οι δυο CARs αναγνώριζαν CD19<sup>+</sup> κύτταρα στόχους και το Western Blot έδειξε όμοια CAR έκφραση. Όμως τα CAR T cells με το μικρότερο spacer παρουσίασαν μεγαλύτερα επίπεδα IFN $\gamma$  και καλύτερη, πιο αποδοτική σηματοδότηση μετά την αναγνώριση του στόχου. Επιπλέον τα κύτταρα με το short spacer παρουσίασαν αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και *in vitro* και *in vivo* σε μοντέλα ποντικών. Με ίδια δόση  $2.5 \times 10^6$  CAR T cells σε ποντίκια, τα CAR T cells με long spacers ήταν αναποτελεσματικά ως προς την αντικαρκινική τους δράση. Αντίθετα, αυτά με short spacers παρουσίασαν ικανοποιητική κυτταρολυτική δράση με την ίδια δόση. CARs με long spacers σχετίστηκαν με θάνατο επαγόμενο από ενεργοποίηση των CAR T cells *in vivo*, ενώ παρατηρήθηκε και μια τάση να συνωστίζονται στους πνεύμονες των ποντικών, σε αντίθεση με τα CAR T cells με short spacers που ανιχνεύονταν ακόμα στο αίμα των ποντικών (Hudecek et al., 2015). Σε αντίστοιχη ερευνά από την ίδια ομάδα, με anti-ROR1 CARs με scFv από R11 mAb φάνηκε ότι αυτά τα CAR T cells απαιτούν την ύπαρξη μεγαλύτερου μήκους spacer για την σωστή αναγνώριση του ROR1 membrane-proximal επίτοπου. Τα παραπάνω δείχνουν ότι το μήκος του spacer/HD μπορεί να επηρεάσει την αναγνώριση του όγκου ανάλογα με το μόριο και τον επίτοπο στόχευσης καθώς και τον πολλαπλασιασμό, δραστηκές λειτουργίες και επιβίωση των CAR T cells *in vivo*. Τα αποτελέσματα ακόμα και τώρα δεν είναι τόσο ικανοποιητικά για να πούμε με ακρίβεια την επίδραση της κάθε HD/spacer περιοχής στην δράση των CAR T cells

και περισσότερες έρευνες απαιτούνται για τον καθορισμό της στην κατασκευή των CARs (Hudecek et al., 2015).

### **Διαμεμβρανική περιοχή (TMD)**

Η διαμεμβρανική περιοχή συνδέει την εξωκυττάρια περιοχή δέσμησης αντιγόνου με την ενδοκυττάρια, συντελώντας παράλληλα στην μεταγωγή του σήματος ανίχνευσης του συνδέτη στόχου προς την ενδοκυτταρική κυτταροπλασματική περιοχή του CAR T cell. Παρέχει σταθερότητα στον συνθετικό υποδοχέα αγκυρώνοντας τον στην μεμβράνη του T λεμφοκυττάρου, διαδραματίζοντας παράλληλα σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση έκφρασης του CAR στην κυτταρική επιφάνεια των τροποποιημένων T και την λειτουργικότητα τους ανάλογα με τα μόρια προέλευσης της (Fujiwara et al., 2020). Η διαμεμβρανική περιοχή των CAR T cells συνήθως αποτελείται από διμερή (ομοδιμερή/ετεροδιμερή) CD3ζ, CD4, CD8 και CD28 προέλευσης. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην λειτουργικότητα των CAR T cells, παρά την αρχική άποψη ότι έχει μόνο δομικό χαρακτήρα, και σε συνεργασία με το HD τμήμα επηρεάζουν την έκφραση των CARs στην κυτταρική μεμβράνη. Το HD εικάζεται ότι επηρεάζει τον ρυθμό μεταφοράς των CARs στην κυτταρική μεμβράνη μετά την πρωτεϊνοσύνθεση και όπως αναφέρθηκε ο αριθμός των αμινοξέων, το μήκος δηλαδή του spacer επιδρά στην έκφραση των CARs επιδρώντας στην αναδίπλωση και ευκαμψία της εξωκυτταρικής περιοχής με το scFv. Η διαφορετικότητα στην δομή της διαμεμβρανικής περιοχής παρουσιάζει διαφορές στα επίπεδα και την σταθερότητα έκφρασης των CARs, αποτελώντας καθοριστικό παράγοντα στην επιλογή για την κατασκευή τους (C. Zhang, Liu, et al., 2017). Διαμεμβρανικής περιοχές CD3ζ προέλευσης, μέσω ενεργοποίησης του T λεμφοκυττάρου οδήγησαν σε CAR διμερισμό και αλληλεπίδραση με το ενδογενές TCR complex με αποτέλεσμα την αύξηση CD3ε έκφρασης. Point mutations στην διαμεμβρανική περιοχή των CARs διέκοψαν αυτές τις αλληλεπιδράσεις, μειώνοντας παράλληλα την δράση των MFE23 CAR T cells με CD3ζ-TMD με στόχο το καρκινοεμβυϊκό αντιγόνο. Βέβαια ο σχηματισμός συμπλόκων της TMD CD3ζ προέλευσης με τα ενδογενή τμήματα του TCR/CD3 complex των T λεμφοκυττάρων, μάλλον σχετίζεται με την μειωμένη σταθερότητα των CARs που παρουσιάζουν τέτοια τύπου CAR T cells (Bridgeman et al., 2010). CD3ζ-TMD CARs 1<sup>ης</sup> γενιάς παρουσίασαν λιγότερη σταθερότητα μακροχρόνια σε σχέση με CD28-TMD CARs 2<sup>ης</sup> γενιάς με κοινό στόχο το CD19. Σε CAR T cells με διαμεμβρανική περιοχή CD28 προέλευσης, παρατηρήθηκε ετεροδιμερισμός του CD28-TMD CAR με το ενδογενές CD28. Τα CD8-TMD CARs όμως δεν παρουσίασαν κάποια αλληλεπίδραση με το CD28, γεγονός που δείχνει την αλληλεπίδραση της διαμεμβρανικής CD28 περιοχής του CAR με το CD28 συνδιεγερτικό μόριο. Αποτέλεσμα του σχηματισμού του CAR/CD28 ετεροδιμερούς αποτέλεσε η μείωση του CD28 στην κυτταρική μεμβράνη των CAR T cells ενώ το ετεροδιμερές δεν παρουσίασε αντίδραση με τα CD80 και CD86 μόρια (B7.1 και B7.2), τους φυσικούς συνδέτες του CD28. Όμως, CD28-TMD σε anti-CD19 CAR T cells φαίνεται να σχετίζεται με σοβαρές νευροτοξικότητες. Ο λόγος μάλλον βρίσκεται στην αλληλεπίδραση που παρουσιάστηκε και τον σχηματισμό του CD28-TMD CAR/CD28 διμερούς που πιθανόν να κάνει τα CAR T cells πιο ευαίσθητα στην ενεργοποίηση τους εναντίον κυττάρων με χαμηλή CD19 έκφραση, όπως τα CD19<sup>+</sup> mural cells του εγκεφάλου, γεγονός που μπορεί να εξηγήει τις νευροτοξικότητες (Muller et al., 2021). Συνοψίζοντας, οι διαμεμβρανικές περιοχές

μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα έκφρασης και την σταθερότητα των CARs. Ακόμα δεν υπάρχει πολλή γνώση πάνω σε αυτό το αντικείμενο. Η ικανότητα των TMDs να αλληλοεπιδρούν με ενδογενή μόρια του TCR και των συναφών μορίων των T λεμφοκυττάρων με ποικίλα αποτελέσματα, μαρτυρούν την αναγκαιότητα για περαιτέρω μελέτη πάνω στην επίδραση τους στην σηματοδότηση, ενεργοποίηση των CAR T cells και της CAR έκφρασης (Fujiwara et al., 2020; Jayaraman et al., 2020).

### **Ενδοκυτταρική περιοχή (ICD)**

Παρόμοια με την ενεργοποίηση των φυσιολογικών T, η ενεργοποίηση των CAR T cells μετά το ερέθισμα αρχίζει με την φωσφορυλίωση των CD3ζ αλυσίδων στις ITAM αλληλουχίες από την Lck. Ακολουθεί η στρατολόγηση της ZAP-70 και ενεργοποίηση της από την Lck και η στρατολόγηση άλλων σηματοδοτικών πρωτεϊνών που οδηγούν στην ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού και την επαγωγή του NFAT μεταγραφικού παράγοντα που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της ενεργοποίησης, διαφοροποίηση και λειτουργία των T λεμφοκυττάρων (Lindner et al., 2020; Macian, 2005; Smith-Garvin et al., 2009).

Οι ενδοκυτταρικές περιοχές των CARs 1<sup>ης</sup> γενιάς αποτελούνταν μόνο από τις CD3ζ αλυσίδες και το ομοδιμερές αυτό συνδεόταν με έναν εξωκυτταρικό μηχανισμό αναγνώρισης και δέσμευσης δημιουργώντας μια σχετικά απλή δομή χαμηλής σηματοδότησης άρα και μικρής αποτελεσματικότητας. Η πραγματική επίδραση της ενδοκυτταρικής σηματοδοτικής περιοχής στην αποτελεσματικότητα των CAR T cells φάνηκε με την δημιουργία CARs 2<sup>ης</sup> γενιάς και την χρήση ενός costimulatory μορίου του T λεμφοκυττάρου (CD28 ή 4-1BB) in cis με τις CD3ζ αλυσίδες (Sadelain, Brentjens, & Rivière, 2013). Τα CD28 και 4-1BB μόρια κατέχουν καθοριστικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αποτροπή του T cell anergy, ενός μηχανισμού ανοχής ο οποίος καθιστά τα T λεμφοκύτταρα μη λειτουργικά κατά την σύνδεση τους με τον συνδέτη, και την διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων αντίστοιχα. Όντας και τα δυο συνδιεγερτικά μόρια του TCR-CD3 complex, συντελούν στην μεταγωγή του 2<sup>ου</sup> σήματος για την σωστή ενεργοποίηση του T λεμφοκυττάρου μέσω συνδιέγερσης (Sharpe, 2009). Η προσθήκη των μορίων αυτών στην ενδοκυτταρική περιοχή των CARs 2<sup>ης</sup> (μεμονωμένη χρήση ενός μορίου στην σηματοδοτική περιοχή) και 3<sup>ης</sup> γενιάς (ταυτόχρονη χρήση CD28 και 4-1BB) σε συνδυασμό με τις CD3ζ αλυσίδες, παρουσίασαν αυξημένη σηματοδότηση με ιδιαίτερα βελτιωμένη αποτελεσματικότητα, ειδικά σε αιματολογικές κακοήθειες, με το CD19 μόριο να είναι ο πιο συχνός στόχος τέτοιων μελετών (X. Y. Tang et al., 2016). Όπως στα φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα έτσι και στα CAR T cells παρουσιάζεται άμεση συσχέτιση της σηματοδότησης και των αλληλουχιών ITAMs, καθώς ο αριθμός των λειτουργικών ITAMs στην ενδοκυτταρική περιοχή έχει άμεσο αντίκτυπο στην σηματοδότηση. Αυτό φάνηκε από τις πρώτες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για την ύπαρξη μιας εναλλακτικής επιλογής για την αντικατάσταση των CD3ζ αλυσίδων σε CARs 1<sup>ης</sup> γενιάς με FcεR1-γ σηματοδοτική περιοχή. Οι CD3ζ-based CARs παρουσίασαν μεγαλύτερη αντικαρκινική κυτταρολυτική δράση και παραγωγή IFNγ συγκριτικά με τα FcεR1-γ based CAR T cells. 1<sup>ης</sup> γενιάς FcεR1-γ-based anti-CEA CARs που κατέχουν 1 ITAM αλληλουχία φάνηκαν χαμηλότερης αποτελεσματικότητας σε σύγκριση με CD3ζ-based CAR T cells ομοίου στόχου, γεγονός το οποίο οφείλεται στην αυξημένη σηματοδοτικότητα των CD3ζ-based CAR T cells με τις 3 ITAMs σε

κάθε αλυσίδα του ομοδιμερούς CD3ζζ. 2<sup>ης</sup> γενιάς CAR T cells με 4-1BB.CD3ζ ενδοκυτταρική περιοχή παρουσίασαν μεγαλύτερο persistence στον όγκο in vitro σε σχέση με αντίστοιχα CD28-CD3ζ ICD σκευάσματα. Η υπόθεση για αυτό είναι ο σχηματισμός καλύτερης ποιότητας ανοσοσύναψης των 4-1BB-based CAR T cells με τα κύτταρα στόχους. Αυτό όμως ήρθε με διαφορά στην άμεση κυτταρολυτική δράση των δυο ειδών CARs, με τους CD28-based να παρέχουν πιο έντονη και γρήγορη δράση συγκριτικά με του 4-1BB (Haynes et al., 2001). Τα ευρήματα αυτά ήρθαν να συμπληρώσουν τα αποτελέσματα μιας άλλης ερευνάς που μέσω φασματοσκοπικής ανάλυσης έδειξαν πιο έντονη και γρήγορη φωσφορυλίωση, με πιο ισχυρή σηματοδότηση σε CD28.CD3ζ CAR T cells 2<sup>ης</sup> γενιάς, σε σύγκριση με 4-1BB.CD3ζ 2<sup>ης</sup> γενιάς CAR T cells. Η ανάλυση έδειξε ότι το αρχικό ερέθισμα οδήγησε σε ίδια σηματοδοτικά μονοπάτια αλλά η διαφορά έγκειται στην ταχύτητα και ένταση φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του CAR T cell. Το σήμα μετά την σύνδεση με τον αντίστοιχο συνδέτη επηρεάζει προφανώς την διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων και την υιοθέτηση δραστικού φαινοτύπου ή φαινοτύπου κυττάρων μνήμης. Πιο γρήγορη και έντονη φωσφορυλίωση παρατηρήθηκε στα CD28.CD3ζ CD8<sup>+</sup> CAR T cells που χρησιμοποιήθηκαν, με αποτέλεσμα ένα πιο ισχυρό σήμα και την εκδήλωση δραστικού φαινότυπου (effector phenotype). Δεν παρατηρήθηκε βέβαια μακροχρόνια ενεργοποίηση in vivo αλλά αυξημένες μικρής διάρκειας αποκρίσεις. Το ισχυρότερο σήμα στα CD28.CD3ζ CAR T cells φαίνεται να σχετίζεται με την πιο έντονη δράση της Lck κινάσης και πιο γρήγορης και έντονης φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών κατά την ενεργοποίηση των CAR T cells. Τα 4-1BB.CD3ζ CD8<sup>+</sup> CAR T cells παρουσίασαν ένα πιο αδύναμο σήμα και μακροχρόνια ενεργοποίηση/επαγωγή in vivo σε αντίθεση με τα προηγούμενα CD28-based CAR T cells, γεγονός που οφείλεται στην πιο αργή και λιγότερο έντονη φωσφορυλίωση που παρατηρήθηκε στην ενδοκυτταρική περιοχή 4-1BB προέλευσης. Το πιο αδύναμο σήμα συντέλεσε στην έκφραση αντιαποπτωτικών γονιδίων και γονιδίων που σχετίζονται με την μνήμη στα T λεμφοκύτταρα και συνεπώς εγκατάσταση ενός φαινοτύπου “ανοσολογικής μνήμης” από τα 4-1BB.CD3ζ CAR T cells. Οι συγγραφείς αναφέρουν επίσης ότι ενδιαφέρον παρουσιάζει η ιδέα επίδρασης στο σήμα για την ρύθμιση των επιθυμητών αποτελεσμάτων μέσω point mutations σε τυροσίνες και προλίνες της CD28 ενδοκυτταρικής σηματοδοτικής περιοχής (Salter et al., 2018).

Γενικά, τα CAR T cells 2<sup>ης</sup> γενιάς με CD28.CD3ζ ενδοκυτταρική περιοχή παρουσιάζονται πιο δραστικά, με ισχυρότερες αποκρίσεις σε μικρό χρονικό διάστημα, ενώ τα 4-1BB.CD3ζ πιο αποτελεσματικά σε βάθος χρόνου αλλά με λιγότερο ισχυρές αποκρίσεις (Kawalekar et al., 2016; Ying et al., 2019).

Σε κλινική μελέτη, 2 στους 3 ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία παρουσίασαν πλήρη ύφεση κατά την αγωγή τους με 2<sup>ης</sup> γενιάς 4-1BB.CD3ζ CAR T cells. Λόγω της μακροχρόνιας επαγωγής/ενεργοποίησης in vivo, παρουσιάζεται ένα πιο ευρύ χρονικό φάσμα πιθανής υποτροπής με την χρήση 4-1BB.CD3ζ CAR T cells. Η προσθήκη ενός επιπλέον costimulatory μορίου στην ήδη υπάρχουσα σειρά συνδιεγερτικό μόριο.CD3ζ στην ενδοκυτταρική περιοχή παρουσίασε πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα με την δημιουργία CARs 3<sup>ης</sup> γενιάς. Προσθήκη 4-1BB σε CD28.CD3ζ σηματοδοτική περιοχή έδειξε πιο ισχυρές αποκρίσεις in vivo από CARs 2<sup>ης</sup> γενιάς. Σε άμεση σύγκριση CARs 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> γενιάς, τα αποτελέσματα έδειξαν πιο

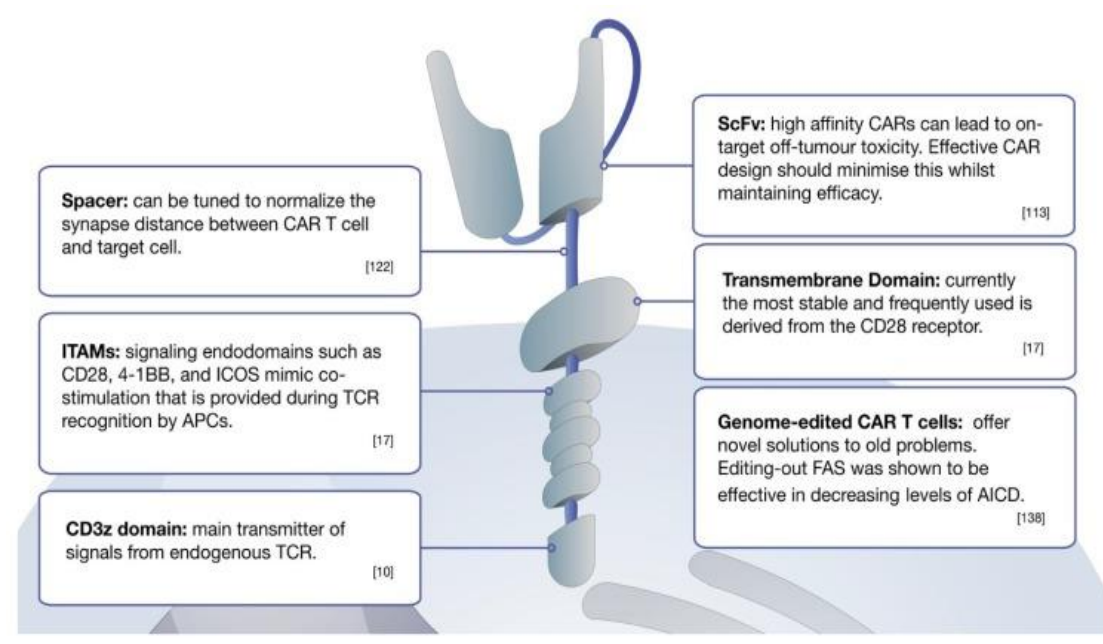
έντονη φωσφορυλίωση σηματοδοτικών πρωτεϊνών και πιο ισχυρό σήμα στους CARs 3<sup>ης</sup> γενιάς με 4-1BB.CD28.CD3ζ. Τα CAR T cells 3<sup>ης</sup> γενιάς παρουσίασαν μεγαλύτερη ενδοκυτταρική σηματοδοτική δραστηριότητα και αυξημένη ικανότητα κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Karlsson et al., 2015). Anti-CD19 CAR T cells 3<sup>ης</sup> γενιάς σε λέμφωμα, με 4-1BB.CD28.CD3ζ ενδοκυτταρική περιοχή, παρουσίασαν περισσότερη αύξηση από CAR T cells 2<sup>ης</sup> γενιάς με CD28.CD3ζ ενδοκυτταρική περιοχή (Ramos et al., 2018). Προκλινική μελέτη με anti-PSCA CARs σε xenografts καρκίνου παγκρέατος σε ποντίκια, έδειξε καλύτερη in vivo ενεργοποίηση/επαγωγή σε CAR T cells 3<sup>ης</sup> γενιάς με σηματοδοτική περιοχή CD28.4-1BB.CD3ζ σε σύγκριση με 2<sup>ης</sup> γενιάς CD28 προέλευσης. Σε αντίθεση όμως με τα παραπάνω αποτελέσματα των άλλων ερευνών παρατηρήθηκε περισσότερη αντικαρκινική δράση στους CARs 2<sup>ης</sup> γενιάς. Βέβαια πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν η ύπαρξη της μεγάλης ετερογένειας μεταξύ των ασθενών ακόμα και σε ίδιους τύπους καρκίνου καθώς και το ιστορικό των θεραπευτικών αγωγών που έχουν λάβει, γεγονός που περιπλέκει ακόμα περισσότερο τα πράγματα (Abate-Daga et al., 2014).

Εκτός από τα κλασσικά CD28 και 4-1BB και άλλα συνδιεγερτικά μόρια όπως OX40 και ICOS, έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή των CARs 3<sup>ης</sup> γενιάς, με θετικά πολλές φορές αποτελέσματα (Guedan et al., 2018). Με προσθήκη OX40 στην σηματοδοτική περιοχή, anti-GD2 CD28.OX40.CD3ζ CAR T cells παρουσίασαν αυξημένο πολλαπλασιασμό σε σχέση με CAR T cells 2<sup>ης</sup> γενιάς με βάση το CD28 (Pulè et al., 2005). Οι 3<sup>ης</sup> γενιάς ICOS.4-1BB.CD3ζ anti-MSLN CARs παρείχαν ισχυρότερη αντικαρκινική δράση και persistence συγκριτικά με CARs 2<sup>ης</sup> γενιάς (Guedan et al., 2018). Ενδιαφέρον ακόμα παρουσιάζει η επίδραση των συνδυασμών των συνδιεγερτικών μορίων καθώς και η σειρά-αλληλουχία τους στην σηματοδοτική περιοχή (Quintarelli et al., 2018). Για παράδειγμα, η αντικατάσταση του CD28 με το 4-1BB στην ενδοκυτταρική περιοχή σε CARs 2<sup>ης</sup> γενιάς οδήγησε στην εξάλειψη του τονικού σήματος που παρουσίαζαν τα CD28-based CAR T cells λόγω δημιουργίας CAR συσσωματωμάτων στην κυτταρική τους επιφάνεια. Αξιοσημείωτο βέβαια ήταν ότι τα 4-1BB.CD28-based CAR T cells 3<sup>ης</sup> γενιάς παρουσίασαν ελάχιστο τονικό σήμα (Long et al., 2015). Σύγκριση CARs με CD28.CD3ζ και CD3ζ.CD28 σηματοδοτική περιοχή, έδειξε μεγαλύτερη έκκριση IL-2 και κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα CD28.CD3ζ CAR T cells, κάτι που μπορεί να εξηγείται με την επίδραση της αλληλουχίας των μορίων που απαρτίζουν την ενδοκυτταρική περιοχή ενός CAR στην σταθερότητα του και την σηματοδότηση κατά την ενεργοποίησή του (Maher et al., 2002). Πολλά είναι ακόμα τα ερωτηματικά, οι παράμετροι και οι συνδυασμοί που πρέπει να μελετηθούν για την ρύθμιση της δομής και την γενική βελτίωση της αποτελεσματικότητας των CAR T cells με απώτερο σκοπό την δημιουργία ενός ιδανικού CAR (Hong, Clubb, & Chen, 2020; Jayaraman et al., 2020).

### **Άλλοι στόχοι**

Οι CARs επιπλέον μπορούν να αναγνωρίσουν όχι μόνο πρωτεϊνικά μόρια αλλά και υδατανθρακικές και γλυκολιπιδικές δομές στην κυτταρική επιφάνεια επεκτείνοντας έτσι το εύρος των πιθανών στόχων τους και την ευελιξία της χρήσης τους καθιστώντας ικανά τα CAR T λεμφοκύτταρα να χρησιμοποιηθούν σε με ευρεία γκάμα εναντίον ποικίλων ειδών κακοηθειών και άλλων παθήσεων (Seif, Einsele, & Löffler, 2019). Λίγες θεραπευτικές προσεγγίσεις με CAR T cells για ιικές λοιμώξεις έχουν περιγραφεί

στη βιβλιογραφία μέχρι στιγμής με κύριο στόχο όπως φαίνεται να αποτελεί ο HIV-1 (Hale et al., 2017; Zhen et al., 2015). Προφανής στόχος του ιού αποτελεί η θέση πρόσδεσης του CD4, στην γλυκοπρωτεΐνη φακέλου gp120 του ιού. Ενδιαφέρον παρουσιάζει μια έρευνα κάνοντας χρήση διεδικών CARs για την ταυτόχρονη στόχευση δυο επίτοπων στην gp120 του HIV-1, με την χρήση του CD4 μορίου στον εξωκυτταρικό μηχανισμό αναγνώρισης των CAR T cells (Ghanem et al., 2018; Leibman et al., 2017). Τελευταία έγιναν και προσπάθειες με CAR προϊόντα με στόχο τον SARS-CoV-2, αλλά και άλλους ιούς όπως Ιός Ηπατίτιδας Β, Ιός Ηπατίτιδας C, καταπολέμηση ασπεργίλλωσης και άλλων μυκητιάσεων. Χρήση των CAR T cells παρατηρείται ακόμα για την αντιμετώπιση αυτοάνοσων παθήσεων καθώς και στην διαδικασία της μεταμόσχευσης οργάνων (Bohne et al., 2008; Fu et al., 2021; Kumaresan et al., 2014; M. T. Ma et al., 2021; Maldini, Ellis, & Riley, 2018; Sautto et al., 2016).



**Εικόνα 4:** Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων που απαρτίζουν την δομή ενός χμαιρικού αντιγονικού υποδοχέα. *scFv*, *spacer*, διαμεμβρανική περιοχή, ενδοκυτταρική περιοχή με τις *ITAM* αλληλουχίες. Τα «κομμάτια» του CAR παρέχουν και τις αντίστοιχες ιδιότητες των τμημάτων προέλευσής τους (Benmeharek et al., 2019)

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ CAR T ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ**

Η παραγωγή των CAR T cells αποτελεί μια σειρά καλά οργανωμένων και προσεκτικών βημάτων. Δοκιμές ποιοτικού ελέγχου εκτελούνται καθ' όλη την διάρκεια του πρωτόκολλου κατασκευής τους, καθώς η τελική ποιότητα του CAR T προϊόντος θα επηρεάσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα της θεραπείας (Levine, Miskin, Wonnacott, & Keir, 2017). Μια τυπική διαδικασία παραγωγής CAR T λεμφοκυττάρων ακολουθεί τα εξής βήματα:



## Λευκαφαίρεση

Το πρώτο βήμα για την παραγωγή των CAR T cells ξεκινάει με την διαδικασία την λευκαφαίρεσης. Αναφερόμαστε στην μηχανική συλλογή κυττάρων από το αίμα του ασθενούς, τον διαχωρισμό των λευκοκυττάρων και την επιστροφή των υπολοίπων κυττάρων και πλάσματος πίσω στην κυκλοφορία του αίματος. Με τον τρόπο αυτό θα πρέπει να έχει συλλεχθεί μια ικανοποιητική ποσότητα λευκοκυττάρων και θα πρέπει να ακολουθήσει ο εμπλουτισμός των T λεμφοκυττάρων. Μετά την έκπλυση των λευκοκυττάρων από το διάλυμα λευκαφαίρεσης που περιέχει αντιπηκτικούς παράγοντες, τα κύτταρα διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους και την πυκνότητα τους με counterflow centrifugal elutriation. Ένα ακόμη βήμα ίσως χρειαστεί για τον διαχωρισμό των T λεμφοκυττάρων σε CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> πληθυσμούς, συνήθως με ειδικές μαγνητικές χάντρες, επικαλυμμένες με εξειδικευμένα αντισώματα, για την σύζευξη κυττάρων ή βιομορίων (Jo et al., 2021; Levine et al., 2017).

## Ex vivo ανάπτυξη

Τα T λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται με magnetic beads επικαλυμμένες με anti-CD3/anti-CD28 μονοκλωνικά αντισώματα ή artificial APCs (aAPCs). Άλλοι τρόποι έχουν χρησιμοποιηθεί όπως anti-CD3 αντισώματα με ή χωρίς feeder cells και αυξητικούς παράγοντες, αλλά δεν είναι τόσο ικανοποιητικό το αποτέλεσμα σε σχέση με τις παραπάνω μεθόδους. Επιπλέον, εξετάζονται τεχνικές καλλιέργειας για την καθοδηγούμενη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων προς επιθυμητούς φαινότυπους. Τα T λεμφοκύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν σε μεγάλους αριθμούς σε βιοαντιδραστήρα παρουσία aAPCs και IL-2. Κατά την διαδικασία ενεργοποίησής τους τα T λεμφοκύτταρα επωάζονται με τον ικό φορέα του CAR διαγονιδίου. Μετά από ημέρες ο φορέας εκπλένεται από την καλλιέργεια με διάλυση ή αλλαγή μέσου (medium exchange). Η καλλιέργεια των T λεμφοκυττάρων με τον ικό φορέα και τα aAPCs/beads στον βιοαντιδραστήρα διαρκεί 9-11 ημέρες. Μέχρι το τέλος της παραγωγής η καλλιέργεια των CAR T cells μπορεί να έχει φτάσει και τα 5 L. Τα aAPCs/beads μπορούν να αφαιρεθούν εύκολα από την καλλιέργεια με μαγνητικό διαχωρισμό και ακολουθεί πλύση και συγκέντρωση των κυττάρων. Το προϊόν στο τέλος, διατηρείται σε κρυσυντήρηση με μέσο κατάλληλο για έγχυση. Τα CAR T cells μεταφέρονται σε κλινικές για την χορήγησή τους σε ασθενείς (Guedan et al., 2014; Levine et al., 2017; Suhoski et al., 2007; Tyagarajan, Spencer, & Smith, 2020).

## Κυτταρικοί T πληθυσμοί

Γενικά, εμφανίζεται μια μεγάλη ποικιλία στην μακροχρόνια και αποτελεσματική ενεργοποίηση των γενετικά τροποποιημένων T λεμφοκυττάρων και πολλές φορές κρίνεται μη αποτελεσματική στις κλινικές δοκιμές. Αυτό ίσως προκύπτει, από την διαφορετική σύνθεση των πληθυσμών των T λεμφοκυττάρων που χρησιμοποιούνται για την εκάστη έρευνα. Παρατηρεί κανείς ότι άλλες έρευνες κάνουν χρήση μιας μίξης CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων, ενώ άλλες να κάνουν έγχυση μόνο CD8<sup>+</sup> T κυτταροτοξικών πληθυσμών (Maus et al., 2014; Shah, Highfill, et al., 2020). Πάντως η χορήγηση πληθυσμών CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> CAR T κυττάρων με αναλογία 1:1 φαίνεται να μπορεί να παρουσιάσει ολικές υφέσεις σε άτομα με υψηλό καρκινικό φορτίο (Sommermeier et al., 2016; Turtle et al., 2016). Επίσης, ένας άλλος σημαντικός παράγοντας της αποτελεσματικότητας της θεραπείας, είναι οι εγγενείς ικανότητες και

η προοπτική ανάπτυξης των T λεμφοκυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν ανάλογα με το στάδιο διαφοροποίησης τους. Μετά την έξοδο τους από τον θύμο αδένα, τα naïve T λεμφοκύτταρα με την ενεργοποίησή τους περνούν μέσα από στάδια διαφοροποίησης σε T λεμφοκύτταρα κεντρικής μνήμης (T<sub>CM</sub>), T λεμφοκύτταρα δραστικής μνήμης (T<sub>EM</sub>) και δραστικά T λεμφοκύτταρα (T<sub>E</sub>). Τα τροποποιημένα λεμφοκύτταρα που χρησιμοποιούνται για την έγχυση στους ασθενείς, προκύπτουν από μη επιλεγμένα T λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από το περιφερικό αίμα, οπότε και το τελικό προϊόν θα αποτελείται από απρόβλεπτες κυτταρικές υποομάδες που η κάθε μια θα έχει τις δικές της ιδιότητες. Θεωρείται ότι η τροποποίηση των naïve T λεμφοκυττάρων και των T<sub>CM</sub> κυττάρων μπορεί να επιφέρει και ανώτερη θεραπευτική αποτελεσματικότητα (Gattinoni et al., 2005; Hinrichs et al., 2009). Κάτι που πρέπει επίσης να ληφθεί σοβαρά υπ' όψιν, είναι και οι συνθήκες τις καλλιέργειας των T λεμφοκυττάρων κατά την τροποποίησή τους, για την παραγωγή των CAR T cells. Η γονιδιακή μεταφορά για τον επαναπρογραμματισμό των T λεμφοκυττάρων συνήθως πραγματοποιείται μετά από την ενεργοποίησή τους και καλλιέργεια παρουσία μεγάλων ποσοτήτων IL-2, με αποτέλεσμα την επαγωγή διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων προς δραστικούς φαινότυπους (Kaartinen et al., 2017). Αντίθετα, η καλλιέργεια παρουσία IL-7 και IL-15 φαίνεται να προάγει την ανάπτυξη των T λεμφοκυττάρων με φαινότυπους πρώιμης διαφοροποίησης, κάτι που μπορεί να επιτρέψει περισσότερη ανάπτυξη in vivo και μακροχρόνια αποτελεσματικότητα (J. Zhou et al., 2019). Μια μελέτη δείχνει, ότι η υιοθέτηση δραστικού φαινότυπου in vitro σχετίζεται με μειωμένη αντικαρκινική δράση των τροποποιημένων CD8<sup>+</sup> T κυττάρων in vivo, ενώ μια άλλη ότι CAR T cells με έκκριση IL-15 παρουσίασαν καλύτερη ανάπτυξη in vivo και βελτιωμένη αντικαρκινική δράση. Έτσι φανερώνεται η σημασία των κυτταρικών πληθυσμών προέλευσης των CAR T cells και οι συνθήκες καλλιέργειας στην μακροχρόνια αποτελεσματικότητα του τελικού προϊόντος (Alizadeh et al., 2019; Gattinoni et al., 2005; Hurton et al., 2016; J. Zhou et al., 2019).

### **Αυτόλογα και ετερόλογα T λεμφοκύτταρα**

Μέσα από την διαδικασία της λευκαφαίρεσης συλλέγονται τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος από τον ασθενή και στην συνέχεια ακολουθεί ο εμπλουτισμός των T λεμφοκυττάρων. Το πλεονέκτημα χρήσης αυτόλογων κυττάρων αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στην εμφάνιση GVHD καθώς τα κύτταρα αυτά έχουν περάσει από τα στάδια της θυμικής επιλογής, όπου και εξαλείφθηκαν τα αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα και σε συνδυασμό με το ότι δεν απαιτείται χειρουργική παρέμβαση για την συλλογή τους αποτελεί ένα λογικό εφελκυστήριο για την όλη διαδικασία τροποποίησης των T λεμφοκυττάρων τα οποία ευκολά συλλέγονται με τυπική λευκαφαίρεση από το περιφερικό αίμα του ασθενούς (Geenen, 2021; Rivière & Sadelain, 2017). Παρ' όλα αυτά, οι αυτόλογες CAR T θεραπείες για την παραγωγή τους απαιτούν πολύ κόστος και χρόνο. Η διαδικασία παραγωγής των αυτόλογων CAR T cells μπορεί να διαρκέσει 2-4 εβδομάδες και ο χρόνος να μην είναι σύμμαχος σε άτομα με μεγάλη εξέλιξη του όγκου ή άτομα με πολύ επιθετικές μορφές καρκίνου. Το κόστος παραγωγής αυτόλογων CAR T cells μπορεί είναι αρκετά υψηλό καθώς αποτελούν μοναδικά προϊόντα για τον κάθε ασθενή και η υλικοτεχνική υποστήριξη μπορεί να δυσκολέψει την παραγωγή για το κάθε άτομο ξεχωριστά. Η ποικιλία και η ποιότητα των αρχικών T λεμφοκυττάρων για την παραγωγή της θεραπείας, επηρεάζει

σημαντικά το τελικό προϊόν. Σε άτομα που υπόκεινται σε χημειοθεραπεία, ασθενείς με HIV-επαγόμενη ανοσοανεπάρκεια και μικρά βρέφη, η χρήση αυτόλογων κυττάρων μπορεί να επιφέρει αρνητικά αποτελέσματα σχετικά με την ισχύ, αποτελεσματικότητα και μακροχρόνια ανθεκτικότητα της θεραπευτικής προσέγγισης. Παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την καταλληλότητα των T λεμφοκυττάρων ενός ασθενούς, λόγω ηλικίας, χρόνιας λοίμωξης, καρκινικού φορτίου και άλλων προηγούμενων αγωγών συμπεριλαμβανομένου και της χημειοθεραπείας στέκονται εμπόδιο στην αποτελεσματικότητα της αυτόλογης CAR T θεραπείας. Βέβαια η ποιότητα και ποσότητα των κυττάρων του ασθενούς μπορούν να επηρεάσουν και την επιτυχία της διαδικασίας παραγωγής των CAR T cells, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατόν ο ασθενής να λάβει καν την θεραπεία. Έτσι προκύπτει η απαίτηση για ασφαλείς, εύκολα διαθέσιμες και αποτελεσματικές “off-the-shelf” CAR T θεραπείες μέσω χρήσης T κυττάρων αλλογενούς προέλευσης (Depil, Duchateau, Grupp, Mufti, & Poirot, 2020; Sanber, Savani, & Jain, 2021). Ετερόλογα δηλαδή λεμφοκύτταρα από κάποιον υγιή δότη, μέσα από τα οποία θα προκύψει η θεραπεία, έτοιμη για τις ανάγκες του ασθενή τον χρόνο που την χρειάζεται. Οι αριθμοί των ετερόλογων T κυττάρων μπορούν να παρέχουν την δυνατότητα μεγάλης παραγωγής CAR T cells, με μικρότερο κόστος, συχνότερους ποιοτικούς ελέγχους και χωρίς ιδιαίτερη πίεση χρόνου για παροχή στον ασθενή. Ο ασθενής μπορεί να λαμβάνει την θεραπεία οπότε την χρειάζεται. Πολλές κλινικές μελέτες χρησιμοποιούν πια αλλογενή T λεμφοκύτταρα δότη για την παραγωγή CAR T cells, καθώς μπορεί να παρέχουν καλύτερη ποιότητα και μεγαλύτερους αριθμούς κατά την συλλογή τους σε σχέση με τα αυτόλογα. Όλα τα παραπάνω οδηγούν στην ανάγκη δημιουργίας αλλογενών CAR T θεραπειών που ενώ παρέχουν πολλές ευκολίες, κρύβουν παράλληλα κινδύνους. Η εκδήλωση GVHD και η απόρριψη του CAR T προϊόντος από τον ασθενή, είναι κίνδυνοι που ακολουθούν την χρήση CAR T κυττάρων αλλογενούς προέλευσης. Τεχνικές όπως η γονιδιακή επεξεργασία και η χρήση εναλλακτικών πηγών κυττάρων για την παραγωγή της θεραπείας που μπορεί να συνδυάσουν όλα τα θετικά που επιθυμούμε μειώνοντας τον κίνδυνο για τον ασθενή θα εξεταστούν σε επόμενο κεφάλαιο (M. A. Morgan, Büning, Sauer, & Schambach, 2020; Y. Yang, Jacoby, & Fry, 2015).

### **Χημειοθεραπεία καταστροφής λεμφοκυττάρων**

Η σημαντικότητα της προθεραπείας, της χρήσης δηλαδή χημικοθεραπευτικών σχημάτων για την καταστροφή λεμφοκυττάρων πριν την έγχυση της θεραπείας, έχει αρχίσει να διαφαίνεται στον χώρο της ACT ανοσοθεραπείας. Ασθενείς που δεν έχουν λάβει χημειοθεραπεία πριν την έγχυση των CAR T cells φαίνεται να έχουν μικρότερη απόκριση στην θεραπεία και τις λιγότερες θεραπευτικές ενδείξεις (Amini et al., 2022). Σε καρκίνους όπως το μελάνωμα, φαίνεται να απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός CAR T cells στην δόση, υψηλότερα επίπεδα κυτοκινών και πιο αποτελεσματική χημειοθεραπεία για την βελτίωση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Σε έρευνα με TIL ανοσοθεραπεία για μελάνωμα, τα αρχικά αποτελέσματα δεν ήταν και τόσο καλά με μικρό ποσοστό απόκρισης στην θεραπεία και παροδική αποτελεσματικότητα. Η αντικαρκινική δράση των TILs όμως παρουσίασε σημαντική βελτίωση με την χρήση χημειοθεραπείας, πριν την έγχυση της θεραπείας. Η προθεραπεία μπορεί να συντελέσει στην ανάπτυξη των naïve T κυττάρων και των T λεμφοκυττάρων μνήμης σε ένα πιο σταθερό περιβάλλον έχοντας πρόσβαση σε κυτοκίνες που διατηρούν την ομοιόστασή

τους όπως IL-7 και IL-15. Επιπλέον σημαντικό είναι ότι αφαιρεί ανασταλτικούς παράγοντες της ανοσολογικής απόκρισης όπως τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα που περιορίζουν την δράση των κυτταροτοξικών CD8<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων (Rohaani, van den Berg, Kvistborg, & Haanen, 2018). Για την αποτελεσματική καταστροφή των T λεμφοκυττάρων, οι ασθενείς που αναμένεται να λάβουν την CAR T cell θεραπεία, λαμβάνουν χημικοθεραπευτικούς παράγοντες όπως κυκλοφωσφαμίδη και fludarabine 2-11 ημέρες πριν την έγχυση της θεραπείας καθώς και μεγάλες δόσεις IL-2 (Fabrizio et al., 2022).

### **Τρόποι μεταφοράς του CAR διαγονιδίου**

Η έκφραση του CAR στα τροποποιημένα T λεμφοκύτταρα μπορεί να χαρακτηριστεί ως προϊόν *ex vivo* γονιδιακής μεταφοράς. Στην *ex vivo* γονιδιακή μεταφορά, ο θεραπευτικός γονιδιακός φορέας εισάγεται σε επιλεγμένο κυτταρικό πληθυσμό που αρχικά έχει απομονωθεί από τον δοτή. Η μεταφορά του διαγονιδίου στα T λεμφοκύτταρα συνήθως πραγματοποιείται με την χρήση ιικού φορέα. Άλλοι τρόποι, όπως μη-ιικοί φορείς ή mRNA ηλεκτροδιάτρηση μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διαδικασία της γονιδιακής μεταφοράς (R. A. Morgan & Boyerinas, 2016).

### **Ιικοί φορείς**

Όταν μιλάμε για ιικούς φορείς αναφερόμαστε σε ειδικά διαμορφωμένους ιούς για την μεταφορά γονιδίων σε κύτταρα της επιλογής μας. Οι ιικοί φορείς παρέχουν αποτελεσματική διαμόλυνση των κυττάρων της καλλιέργειας και αρκετά εξειδικευμένη μεταφορά γονιδίων με καλή αποτελεσματικότητα. Επιπλέον, το μεγαλύτερο μέρος του ιικού γονιδιώματος μπορεί να αντικατασταθεί με το διαγονίδιο ενδιαφέροντος, κάτι που καθιστά βολική την χρήση τους. Οι κύριοι ιικοί φορείς που χρησιμοποιούνται για την μεταφορά του CAR διαγονιδίου στην καλλιέργεια των T λεμφοκυττάρων προέρχονται από lentiviruses (φακοιοί) και gammaretroviruses (Milone & O'Doherty, 2018). Και τα δυο αυτά γένη ιών ανήκουν στην οικογένεια των Retroviridae και το χαρακτηριστικό τους είναι η ενσωμάτωση του γενετικού τους υλικού στα κύτταρα-ξενιστές τους. Αυτή την εγγενή ικανότητα ενσωμάτωσης χρησιμοποιούμε και σήμερα μέσα από τους lentiviral vectors και gammaretroviral vectors, για την ενσωμάτωση του CAR διαγονιδίου στο γονιδίωμα των T λεμφοκυττάρων της καλλιέργειας. Η ενσωμάτωση του γενετικού υλικού των ιικών φορέων μετά την ενδοκύτωση και αποεπένδυση πραγματοποιείται με τα χαρακτηριστικά ικά ένζυμα αντιστροφή μεταγραφάση και ιντεγκράσες. Με καλούπι το RNA γενετικό υλικό των ιών, συντίθεται DNA μέσα από την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και το συμπληρωματικό cDNA ενσωματώνεται από τις ιντεγκράσες στο γονιδίωμα του κυττάρου. Από το ιικό γονιδίωμα, ενσωματωμένο πια στο γονιδίωμα του κυττάρου ως προϊός, μέσα από τους φυσιολογικούς μηχανισμούς έκφρασης του κυττάρου, συντίθεται και οι ικές πρωτεΐνες (Gabriel, Schmidt, & von Kalle, 2012; Hindmarsh & Leis, 1999). Έτσι μέσα από την διαμόλυνση των T λεμφοκυττάρων και την ενσωμάτωση του γονιδιώματος των ιικών φορέων που περιλαμβάνει και το CAR διαγονίδιο, τα τροποποιημένα πια T λεμφοκύτταρα εκφράζουν τους CARs στην κυτταρική τους επιφάνεια. Έτσι η CAR έκφραση διατηρείται κατά την διαίρεση και την ανάπτυξη των T λεμφοκυττάρων σε μεγάλους αριθμούς στην καλλιέργεια (Levine et al., 2017).

Οι πρώτες εφαρμογές της μηχανικής των T λεμφοκυττάρων (T cell engineering) ξεκίνησαν με την χρήση gammaretroviral φορέων για την τροποποίηση T λεμφοκυττάρων ποντικών στις αρχές της δεκαετίας του 90. Οι πρώτοι ρετροϊκοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν για τον λόγο αυτό, βασίστηκαν σε απλούς gammaretroviruses όπως ο Moloney murine leukemia virus (MMLV) και στην συνέχεια στην τεχνική αυτή συμπεριλήφθηκαν και γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου από gibbon ape leukemia virus (GALV), σε μια διαδικασία που ονομάζεται pseudotyping, για την μόλυνση και τροποποίηση ανθρωπίνων T λεμφοκυττάρων. Τα παραπάνω επιτεύγματα άνοιξαν το δρόμο για την ευρεία χρήση ικών φορέων στην σύγχρονη μηχανική των T λεμφοκυττάρων, με τους ρετροϊκούς φορείς να αποτελούν το πρώτο μέσο που χρησιμοποιήθηκε και αξιολογήθηκε στις θεραπείες που βασίζονται σε T λεμφοκύτταρα όπως και η CAR T cell ανοσοθεραπεία (Cooaray, Howe, & Thrasher, 2012; Gutierrez-Guerrero, Cosset, & Verhoeven, 2020).

### **Κατασκευή και ασφάλεια ικών φορέων**

Τα ρετροϊκά γονιδιώματα περιέχουν κάποια πολύ χαρακτηριστικά γονίδια:

- gag, κωδικοποιεί την κύρια δομική πολυπρωτεΐνη Gag απαραίτητη για την συγκρότηση μη-μολυσματικών και ανώριμων ικών σωματιδίων
- pro, κωδικοποιεί τις ικές πρωτεάσες απαραίτητες για την ωρίμανση των ικών σωματιδίων
- pol, τα προϊόντα του pol γονιδίου περιλαμβάνουν την αντιστροφή μεταγραφάση, RNase (ριβονουκλεάση) και τις ιντεγκράσες
- env, που κωδικοποιεί τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες της ικής κυτταρικής επιφανείας που είναι υπεύθυνες για την σύνδεση με τους υποδοχείς του κυττάρου ξενιστή και ένωση των μεμβρανών για την έναρξη της ενδοκύτωσης

Οι σύγχρονες τεχνικές για την κατασκευή ενός ρετροϊκού φορέα αντικαθιστούν αυτές τις αλληλουχίες με το CAR διαγονίδιο της επιλογής μας. Βέβαια η συγκρότηση του ανασυνδυασμένου ικού γονιδιώματος σε ικά σωματίδια απαιτεί και την ταυτόχρονη έκφραση των γονιδίων gag, pol και env. Η παροχή των γονιδίων αυτών πραγματοποιείται μέσω ετερόλογων βοηθητικών πλασμιδίων *in trans* για να αυξηθεί η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα του φορέα. Οι κυτταρικές σειρές πακεταρίσματος (packaging cell lines) των ικών φορέων διαμολύνονται. Έτσι ξεκινάει η σύνθεση πολλών αντιγράφων του ικού γονιδιώματος που πακετάρονται μέσω των δομικών πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την συγκρότηση πολλών ικών σωματιδίων. Επιπλέον για τους lentiviral φορείς, απαιτείται και ένα ακόμη βοηθητικό πλασμίδιο που παρέχεται *in trans* για το rev γονίδιο, το οποίο συντελεί στην εξαγωγή των gag και pol μετάγραφων από τον πυρήνα (Milone & O'Doherty, 2018; R. A. Morgan & Boyerinas, 2016).

Οι ρετροϊοί μπορούν να μολύνουν μόνο κύτταρα τα οποία είναι μιτωτικά ενεργά, ενώ οι lentiviruses μπορούν να στοχεύσουν και μη διαιρούμενα κύτταρα που πρέπει όμως να βρίσκονται τουλάχιστον στην φάση G1b του κυτταρικού κύκλου για να υποστηρίξουν την αντίστροφη μεταγραφή και ενσωμάτωση του γενετικού υλικού. Το γεγονός αυτό προσδίδει ένα πολύ μεγαλύτερο εύρος κυττάρων που μπορούν να διαμολυνθούν με lentiviruses. Επιπλέον, η ενσωμάτωση του γενετικού υλικού των

ρετροϊκών φορέων παρατηρείται κυρίως σε περιοχές όπου βρίσκονται υποκινητές γονιδίων, γεγονός που έχει συσχετιστεί με γονοτοξικότητες, ενώ η ενσωμάτωση για τους lentiviral παρατηρείται σε περιοχές κωδικοποίησης πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό αποτελώντας εν μέρει μια μικρή διαφορά πιστεύεται αποτελεί ικανό παράγοντα διάκρισης της γονοτοξικότητας (Korin & Zack, 1998; R. A. Morgan & Boyerinas, 2016; Naldini et al., 1996). Αν και οι lentiviral vectors θεωρούνται πιο ασφαλείς η αφαίρεση U3 περιοχών από το 3' Long terminal repeat (LTR) μπορεί να αυξήσει την ασφάλεια των φορέων. Η αφαίρεση 300-400 νουκλεοτιδίων φαίνεται να περιορίζει την δράση του LTR υποκινητή δημιουργώντας ένα self-inactivating (SIN) φορέα ανίκανο αναπαραγωγής. Η διαγραφή αυτή συμπεριλαμβάνει και το TATA box αλλά δεν φάνηκε να επηρεάζει την έκφραση των CARs, γεγονός που συντελεί στην διατήρηση της ασφάλειας χωρίς να φαίνεται να επηρεάζει το τελικό προϊόν (Milone & O'Doherty, 2018; Zufferey et al., 1998). Στις κλινικές μελέτες έχει αυξηθεί κατά πάρα πολύ η μεταφορά του CAR διαγονιδίου μέσω lentiviral φορέων καθώς θεωρούνται μια πιο ασφαλής επιλογή που παρέχει μακροχρόνια έκφραση του CAR. Κυρίως έχουν χρησιμοποιηθεί φορείς με βάση τον HIV-1 (Cooray et al., 2012).

## **Άλλα μη-ικά συστήματα γονιδιακής μεταφοράς**

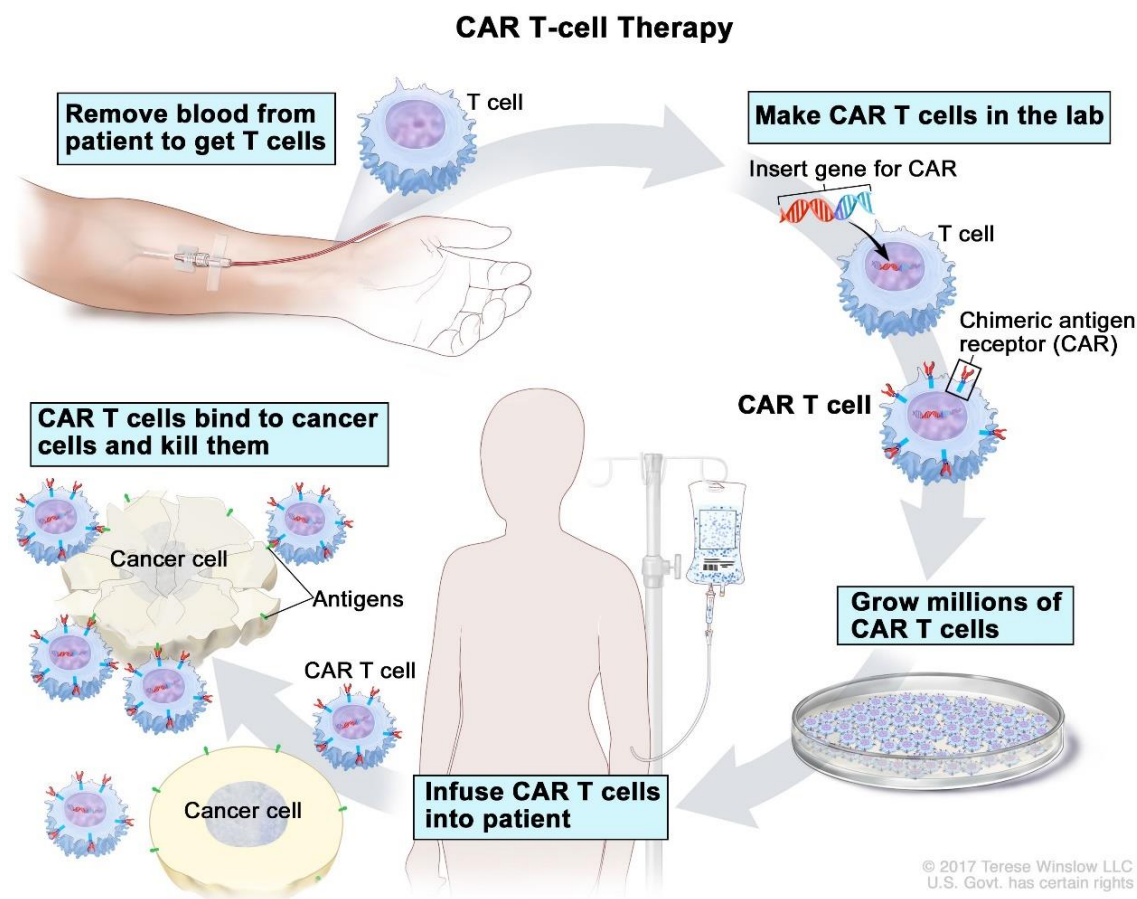
### **Συστήματα τρανσποζονίων**

Τα τρανσποζόνια, γνωστά και ως μετάθετα στοιχεία, αποτελούν DNA αλληλουχίες που μπορούν και μεταφέρονται σε διάφορες θέσεις στο γονιδίωμα, κάτι που τους έχει χαρίσει και το όνομα “jumping genes” καθώς φαίνεται να μεταπηδούν από περιοχή σε περιοχή. Τα DNA τρανσποζόνια αποτελούνται από ένα γονίδιο τρανσποζάσης που περικλείεται από δυο Terminal Inverted Repeats (TIRs). Η τρανσποζάση αναγνωρίζει και κόβει τις TIR αλληλουχίες, το γονίδιο απομακρύνεται και μεταφέρεται σε άλλη περιοχή του γονιδιώματος. Τέτοια συστήματα τρανσποζονίων έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς για την μεταφορά και ενσωμάτωση του γονιδίου επιλογής στο γονιδίωμα του κυττάρου όπως και στην περίπτωση του CAR διαγονιδίου. Το CAR διαγονίδιο τοποθετείται ανάμεσα στις TIR αλληλουχίες σε πλασμίδια, πραγματοποιείται η διαμόλυνση και με χρήση τρανσποζάσης (in trans μέσω πλασμιδίου, mRNA ή πρωτεΐνη) το CAR διαγονίδιο ενσωματώνεται στο γονιδίωμα των T λεμφοκυττάρων (Magnani, Tettamanti, et al., 2020; R. A. Morgan & Boyerinas, 2016). Το πιο ευρέως διαδεδομένο σύστημα τρανσποζονίων για την μεταφορά του CAR διαγονιδίου σε PBMCs, αποτελεί το Sleeping Beauty σύστημα (Singh, Moyes, Huls, & Cooper, 2015). Πολλές επιτυχημένες προσπάθειες για την δημιουργία λειτουργικών CAR T cells έχουν παρατηρηθεί με μεγάλη εφαρμογή στην anti-CD19 CAR θεραπεία. Ο πλασμιδιακός φορέας που φέρει το anti-CD19 CAR διαγονίδιο-τρανσποζόνιο που περικλείεται από τις TIRs και το πλασμίδιο με την τρανσποζάση, μέσω ηλεκτροδιάτρησης εισάγονται σε PBMCs και στην συνέχεια ενεργοποιούνται με CD19<sup>+</sup> aAPCs. Έτσι δημιουργούνται μεγάλοι αριθμοί anti-CD19 CAR T cells για αιματολογικές κακοήθειες (Magnani, Gaipa, et al., 2020). Ένα επιπλέον σύστημα τρανσποζονίων που χρησιμοποιείται αρκετά είναι και το riggyBac σύστημα. Σε προκλινικές μελέτες, έχει παρουσιάσει καλύτερη δράση σε σχέση με την ενσωμάτωση του CAR διαγονιδίου από το Sleeping Beauty, αλλά το γεγονός ότι η ενσωμάτωση στο γονιδίωμα παρατηρείται κοντά σε περιοχές έναρξης της μεταγραφής θέτει ερωτηματικά σε σχέση με την ασφάλεια του (Bishop et al., 2021; Z. Zhang et al., 2019).

## Ηλεκτροδιάτρηση

Η mRNA ηλεκτροδιάτρηση αποτελεί έναν άλλο μηχανισμό εισόδου νουκλεϊκών οξέων και θεωρείται πιο ασφαλής τρόπος από την χρήση ικών ή πλασμιδιακών φορέων. Μπορεί να πραγματοποιηθεί με ηλεκτρικούς παλμούς σε αργά διαιρούμενους κυτταρικούς πληθυσμούς. Δεν απαιτεί κάποια γονιδιωματική ενσωμάτωση οπότε δεν υπάρχει και κίνδυνος ένθετης μεταλλαξιγένεσης όπως στην περίπτωση των ικών φορέων. Όμως, η μικρής διάρκειας φύση του mRNA μπορεί να αποτελέσει ως περιοριστικός παράγοντας για αυτήν την τεχνική καθώς μπορεί να οδηγήσει σε παροδική και εξασθενημένη έκφραση του CAR (Tavernier et al., 2011). Βέβαια πρέπει να εξετάζονται και οι ανάγκες έκφρασης των CARs σε σχέση με την πυκνότητα του αντιγόνου στόχου στα καρκινικά και φυσιολογικά κύτταρα. Οπότε δεν είναι απαραίτητα κάτι το αρνητικό (Lynn et al., 2016). Μια μονή έγχυση anti-CD19 CAR T cells που προέρχονταν από mRNA ηλεκτροδιάτρηση παρουσίασε παρόμοια αποτελεσματικότητα με αντίστοιχα CAR T cells που προέρχονταν από τροποποίηση των T λεμφοκυττάρων μέσω lentiviral φορέων. Όμως τα CAR T cells παρέμειναν ανιχνεύσιμα μόνο μια εβδομάδα μετά την έγχυση τους, κάτι που ενίσχυσε τα παραπάνω λεγόμενα για παροδική έκφραση και έθεσε την υπόθεση για πολλαπλές χορηγήσεις της θεραπείας (Barrett et al., 2013; Barrett et al., 2011).

Παρατηρούμε ότι η ex vivo τροποποίηση των T λεμφοκυττάρων για την έκφραση του χημειοκίτου αντιγονικού υποδοχέα μπορεί να πραγματοποιηθεί με ποικίλους τρόπους. Ιικοί φορείς με βάση τον HIV-1, συστήματα τρανσποζονίων όπως το Sleeping Beauty και το piggyBac και mRNA ηλεκτροδιάτρηση έχουν χρησιμοποιηθεί για τον λόγο αυτό. Παρατηρείται όμως μια γενική κλίση προς του ικούς φορείς. Οι ιικοί φορείς μπορεί να έχουν συσχετιστεί με αυξημένες τοξικότητες και δυσκολίες χειρισμού σε σχέση με τα άλλα, πιο ασφαλή μέσα που προαναφέρθηκαν, αλλά παρουσιάζουν την πιο αποτελεσματική και μακροχρόνια εξυπηρέτηση του σκοπού, που είναι η έκφραση του CAR στην κυτταρική επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων. In vivo τρόποι παραγωγής των CAR T cells έχουν μελετηθεί, αλλά αντιμετωπίζουν ακόμα πολλές δυσκολίες στο εγχείρημα αυτό (R. A. Morgan & Boyerinas, 2016; R. A. Morgan et al., 2010).



**Εικόνα 5:** Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας παραγωγής των CAR T κυττάρων. Λευκαφαίρεση, *ex vivo* γονιδιακή μεταφορά μέσω ιικού φορέα, ανάπτυξη των CAR T κυττάρων, έγχυση της CAR T θεραπείας στον ασθενή, αναγνώριση και κυτταρόλυση του όγκου (<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/t-cell-transfer-therapy>)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΚΑΙ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

#### Εγκεκριμένες CAR T θεραπείες

##### ➤ Kymriah (tisagenlecleucel)

Το 2017 εγκρίθηκε από τον FDA (Food and Drugs Administration) η πρώτη CAR T θεραπεία με το εμπορικό όνομα KYMRIAH και το 2018 εγκρίθηκε και μέσα στα ευρωπαϊκά πλαίσια από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων. Περιέχει την δραστική ουσία tisagenlecleucel (CTL019), προερχομένη από αυτόλογα, γενετικά τροποποιημένα λευκά αιμοσφαίρια (Inaba & Pui, 2019). Τα anti-CD19 CAR T cells της θεραπείας αποτελούνται από murine FMC63 scFv, CD8α HD/TMD, 4-1BB και CD3ζ αλυσίδες στην ενδοκυτταρική σηματοδοτική περιοχή. Φορέας διαγονιδίου: lentiviral φορέας. Το Kymriah, σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων προορίζεται για την θεραπεία των ακολουθών τύπων καρκίνου του αίματος: Οξεία



λεμφοβλαστική λευχαιμία Β κυττάρων (B-ALL) σε παιδιά και νεαρούς ενήλικες ασθενείς, ηλικίας έως 25 ετών με καρκίνο οι οποίοι δεν ανταποκρίθηκαν σε προηγούμενη θεραπεία, υποτροπίασαν δύο ή περισσότερες φορές ή υποτροπίασαν μετά από μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β κύτταρα (DLBCL) και οζώδες λέμφωμα (FL) σε ενήλικες με καρκίνο που υποτροπίασαν ή δεν ανταποκρίθηκαν μετά από δυο ή περισσότερες προηγούμενες θεραπείες.

➤ Yescarta (axicabtagene ciloleucel)

Το Yescarta αποτελεί ανοσοθεραπεία αυτολογων anti-CD19 CAR T κυττάρων. Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων ενδείκνυται για τη θεραπεία ενήλικων ασθενών με ανθεκτικό ή υποτροπιάζον διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β κύτταρα (DLBCL) και πρωτοπαθές λέμφωμα μεσοθωρακίου από μεγάλα Β κύτταρα (PMBCL), έπειτα από δύο ή περισσότερες γραμμές συστηματικώς χορηγούμενης αγωγής. Η δομή του CD19-specific CAR του Yescarta είναι η ακόλουθη: murine FMC63 scFv, CD28 HD/TMD, CD28 και CD3ζ σηματοδοτική περιοχή. Φορέας διαγονιδίου: ρετροϊκός φορέας.

➤ Abecma (idecabtagene vicleucel)

Το Abecma είναι ένα φάρμακο που περιέχει την δραστική ουσία idcabtagene vicleucel. Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων, χρησιμοποιείται για την θεραπεία ενηλίκων με ανθεκτικό ή υποτροπιάζον πολλαπλόν μυέλωμα (R/R MM). Χρησιμοποιείται σε ενήλικες που έχουν λάβει τουλάχιστον τρεις προηγούμενες θεραπείες, συμπεριλαμβανομένων ανοσοτροποποιητικού παράγοντα, αναστολείς πρωτεασώματος και anti-CD38 αντισώματα και των οποίων η νόσος έχει επιδεινωθεί από την τελευταία θεραπευτική αγωγή.

Στόχος των αυτόλογων CAR T κυττάρων του Abecma αποτελεί το B cell maturation antigen (BCMA), το αντιγόνο ωρίμανσης Β κυττάρων, το οποίο εκφράζεται σε ώριμα Β λεμφοκύτταρα (πλασμαβλάστες και πλασμοκύτταρα), παρατηρείται ελάχιστη έκφραση σε αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα ή φυσιολογικό μη-αιμοποιητικό ιστό και υπερεκφράζεται σε αιματολογικές κακοήθειες Β κυττάρων, καθιστώντας το ικανό στόχο ανοσοθεραπείας για το πολλαπλό μυέλωμα. Η δομή των CARs αποτελείται από ένα BCMA-specific scFv, CD8α HD, 4-1BB συνδιέγερση και CD3ζ αλυσίδες στην σηματοδοτική περιοχή.

➤ Breyanzi (lisocabtagene maraleucel)

Το Breyanzi σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων ενδείκνυται για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών με υποτροπιάζον ή ανθεκτικό διάχυτο από μεγάλα Β κύτταρα λέμφωμα (DLBCL), πρωτοπαθές μεσοθωρακικό λέμφωμα μεγάλων Β κυττάρων (PMBCL) και οζώδες λέμφωμα βαθμού 3B (FL3B), μετά από δύο ή περισσότερες γραμμές συστηματικής θεραπείας. Περιέχει 1:1 αναλογία CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> κυτταρικών πληθυσμών. Πρόκειται για αυτόλογα anti-CD19 CAR T cells με δομή: FMC63 scFv, 4-1BB συνδιέγερση και CD3ζ αλυσίδες στην σηματοδοτική ενδοκυτταρική περιοχή και ένα μη λειτουργικό EGFRt. Φορέας διαγονιδίου: lentiviral φορέας

➤ Tecartus (brexucabtagene autoleucel)

Το Tecartus σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων ενδείκνυται για τη θεραπεία ενήλικων ασθενών με υποτροπιάζον ή ανθεκτικό λέμφωμα από κύτταρα μανδύα (MCL) μετά από δύο ή περισσότερες γραμμές συστηματικής θεραπείας, συμπεριλαμβανομένου αναστολέα κινάσης τυροσίνης του Bruton (BTK). Η δομή των αυτόλογων anti-CD19 CAR T κυττάρων του Tecartus είναι η εξής: FMC63 scFv, CD28 συνδιέγερση και CD3ζ αλυσίδες στην σηματοδοτική περιοχή. Φορέας διαγονιδίου: ρετροϊκός φορέας

➤ Carvykti (ciltacabtagene autoleucel)

Το Carvykti σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων ενδείκνυται για την θεραπεία ενηλίκων με ανθεκτικό ή υποτροπιάζον πολλαπλούν μυέλωμα (R/R MM). Χρησιμοποιείται σε ενήλικες που έχουν λάβει τουλάχιστον τρεις προηγούμενες θεραπείες, συμπεριλαμβανομένων ανοσοτροποποιητικού παράγοντα, αναστολείς πρωτεασώματος και anti-CD38 αντισώματα και των οποίων η νόσος έχει επιδεινωθεί από την τελευταία θεραπευτική αγωγή. Η δομή των αυτόλογων anti-BCMA CAR T cells του Carvykti είναι: BCMA-targeting scFvs, 4-1BB συνδιέγερση και CD3ζ σηματοδοτική περιοχή.

\*Τα στοιχεία για τις εγκεκριμένες θεραπείες προέρχονται από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicines Agency)

[https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/kymriah-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/kymriah-epar-medicine-overview_en.pdf)

[https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/yescarta-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/yescarta-epar-medicine-overview_en.pdf)

[https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/abecma-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/abecma-epar-medicine-overview_en.pdf)

[https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/breyanzi-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/breyanzi-epar-medicine-overview_en.pdf)

[https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/tecartus-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/tecartus-epar-medicine-overview_en.pdf)

[https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/carvykti-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/carvykti-epar-medicine-overview_en.pdf)

### FDA-Approved CAR T-Cell Therapies

Generic Name	Brand Name	Target Antigen	Targeted Disease	Patient Population
Tisagenlecleucel	Kymriah	CD19	B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL)	Children and young adults with refractory or relapsed B-cell ALL
			B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL)	Adults with relapsed or refractory B-cell NHL
Axicabtagene ciloleucel	Yescarta	CD19	B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL)	Adults with relapsed or refractory B-cell NHL
			Follicular lymphoma	Adults with relapsed or refractory follicular lymphoma
Brexucabtagene autoleucel	Tecartus	CD19	Mantle cell lymphoma (MCL)	Adults with relapsed or refractory MCL
			B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL)	Adults with refractory or relapsed B-cell ALL
Lisocabtagene maraleucel	Breyanzi	CD19	B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL)	Adults with relapsed or refractory B-cell NHL
Idecabtagene vicleucel	Abecma	BCMA	Multiple myeloma	Adults with relapsed or refractory multiple myeloma
Ciltacabtagene autoleucel	Carvykti	BCMA	Multiple myeloma	Adults with relapsed or refractory multiple myeloma

**Εικόνα 6:** Εγκεκριμένες από τον Food and Drug Administration (FDA) CAR T cell θεραπείες. Δραστική ουσία, εμπορικό όνομα προϊόντος, μόριο-στόχος, ασθένεια, κριτήρια ασθενών (<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells>)

### Συνδυαστικές προσεγγίσεις

#### Immune Checkpoint Inhibitors

Τα immune checkpoint μόρια Programmed cell death-1 protein (PD-1), PD-L1 (συνδέτης του PD-1) και cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές της ανοσολογικής λειτουργίας των T λεμφοκυττάρων. PD-1 και CTLA-4 εκφράζονται στα T λεμφοκύτταρα και μέσω αλληλεπίδρασης με τους συνδέτες τους, περιορίζουν την δράση των T κυττάρων, όταν αυτό απαιτείται για την διατήρηση της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος και την αποφυγή αυτοάνοσων. Παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην ανοσοθεραπεία, καθώς μπορεί να λειτουργήσουν ως ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες υπέρ της ανάπτυξης του όγκου, στην ανοσοδιαφυγή και τις μεταστάσεις (Alsaab et al., 2017; Cai, Wang, Zhang, & Guo, 2019).

Αυξημένη έκφραση PD-L1 παρατηρείται σε πολλούς όγκους διαφορετικών ιστολογικών ειδών όπως το μελάνωμα, καρκίνος του πνεύμονα, του παγκρέατος, του μαστού και των ωθηκών. Η σύνδεση PD-1/PD-L1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων και περιορίζει την επιβίωση τους καθώς και τις δραστικές λειτουργίες τους (κυτταροτοξικότητα και παραγωγή κυτοκινών). Παράλληλα, επάγει κυτταρικό θάνατο μέσα από απόπτωση των tumor-specific T λεμφοκυττάρων και προάγει τη διαφοροποίηση των CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων σε ρυθμιστικά T μέσω μειορύθμισης του Akt, mTOR, ERK2, παρέχοντας έτσι στον όγκο ανθεκτικότητα στην δράση των CD8<sup>+</sup> T κυτταροτοξικών (Cai et al., 2019; Zitvogel & Kroemer, 2012). Η αλληλεπίδραση των checkpoint μορίων PD-1/PD-L1 έχει ως αποτέλεσμα την αποφωσφορυλίωση σηματοδοτικών περιοχών του TCR από SHP-1 και SHP-2 φωσφατάσες (SH2-domain containing protein tyrosine phosphatases) περιορίζοντας και αναστέλλοντας βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων. Φαίνεται ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν

να αυξήσουν την έκφραση του PD-L1 μέσα από την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών από τα T λεμφοκύτταρα ως αποτέλεσμα της αντικαρκινικής τους δράσης, προωθώντας έτσι τις ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες του όγκου μέσω απενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων (Ribas & Hu-Lieskovan, 2016). Το CTLA-4 είναι ομόλογο του CD28 συνδεδεμένου μορίου του TCR, αλλά με μεγαλύτερη δεσμευτική συγγένεια ως προς τα B7 μόρια των APCs. Κατά την αντιγονοπαρουσίαση, η σύνδεση τους μέσω αλληλεπίδρασης των αντιγονοπαρουσιαστικών και T λεμφοκυττάρων, μπλοκάρει την IL-2, τον πολλαπλασιασμό και την δράση των T κυττάρων (Buchbinder & Desai, 2016).

Για τους παραπάνω λόγους τα checkpoint μόρια έχουν γίνει στόχος θεραπειών με μονοκλωνικά αντισώματα για το μπλοκάρισμά τους, σε μια διαδικασία που ουσιαστικά αναστέλλει τους αναστολείς της ανοσολογικής απόκρισης των T λεμφοκυττάρων. Τα checkpoint inhibitors, οι αναστολείς των checkpoint μορίων δηλαδή, έχουν αποτελέσει κλειδί για την καταπολέμηση αρκετών ειδών καρκίνων. Θεραπείες μονοκλωνικών αντισωμάτων, όπως το Ipilimumab και το Tremelimumab, διακόπτουν την αλληλεπίδραση του CTLA-4 με το B7 ενισχύοντας με τον τρόπο αυτή την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων εναντίον του όγκου. Άλλες θεραπείες όπως Pembrolizumab, Nivolumab, Cemiplimab και Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab αποτελούν αναστολείς των PD-1 και PD-L1 αντίστοιχα μπλοκάροντας έτσι την σύνδεση τους και επιτρέπουν την δράση των T λεμφοκυττάρων. Οι επιτυχίες που έχουν παρουσιάσει οι θεραπείες με checkpoint inhibitors, φανερώνουν την ύπαρξη ανοσολογικής απόκρισης T λεμφοκυττάρων ειδικά εναντίον του όγκου η οποία όμως καταπνίγεται από τις ιδιαίτερες ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες του όγκου και του TME. Εγκεκριμένες θεραπείες CI για διάφορες μορφές στερεών όγκων αφορούν: melanoma (anti-PD-1/CTLA-4), non-small cell lung cancer (anti-PD-1), merkel cell carcinoma (anti-PDL-1), carcinoma of the bladder (anti-PD-L1) (Buchbinder & Desai, 2016; Webb et al., 2018; Zitvogel & Kroemer, 2012).

### **Suicide γονίδια**

Τα suicide γονίδια αποτελούν μια καλή λειτουργική προσέγγιση στον χώρο της ασφάλειας της CAR T cell θεραπείας. Αναφερόμαστε σε γονίδια τα οποία συνεκφράζονται με τον CAR και μπορούν να επάγουν επιλεκτικό κυτταρικό θάνατο, μετά την ενεργοποίησή τους από κάποιο παράγοντα, όπως αντισώματα ή φαρμακευτικές ουσίες (Zarogoulidis et al., 2013). Τα suicide γονίδια κωδικοποιούν ένα μη τοξικό μόριο (ένζυμο) ικανό να μετατρέψει ένα μη τοξικό παράγοντα (προφάρμακο) σε τοξικό προϊόν. Τα γονίδια iC9 (inducible caspase 9) και tEGFR (truncated EGFR) μπορούν να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από αντισώματα. Άλλο suicide γονίδιο, HSV-TK (κινάση θυμιδίνης Ερπητοϊού) μετατρέπει σε τοξικό το φάρμακο ganciclovir, διακόπτει την επιμήκυνση των αλυσίδων DNA κατά την S φάση του κυτταρικού κύκλου και προκαλεί κυτταρικό θάνατο από απόπτωση μέσα από το Fas μονοπάτι (Gargett & Brown, 2014; Kao et al., 2019). Τα suicide γονίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον περιορισμό της δράσης των CAR T cells με σκοπό την παροχή ασφάλειας (Budde et al., 2013; Minagawa, Al-Obaidi, & Di Stasi, 2019).

### **CAR T λεμφοκύτταρα διπλής στόχευσης**

Η συχνή εμφάνιση υπότροπων με θετική αλλά και με αρνητική έκφραση του μορίου στόχου, αποτελεί ένα από τα πλέον δύσκολα πρόβλημα προς επίλυση στον χώρο της CAR T ανοσοθεραπείας. Η στόχευση του CD19 μορίου σε αιματολογικές κακοήθειες B κυττάρων να μεν έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα και έγκριση θεραπειών, αλλά οι μελέτες δείχνουν ότι μέχρι και το 25% των ασθενών με B ALL που αρχικά αποκρίθηκαν καλά στην anti-CD19 CAR T cell θεραπεία, μπορούν να παρουσιάσουν υποτροπή με CD19 αρνητική έκφραση, μέσω μείωσης ή έλλειψης έκφρασης του CD19 από τα καρκινικά κύτταρα. Έτσι κρίνεται αναγκαία η βελτίωση της αποτελεσματικότητας και η υιοθέτηση μηχανισμών πρόληψης των υπότροπων (X. Xu et al., 2019). Μια από τις προσεγγίσεις για την εξάλειψη των παραπάνω προβλημάτων που εξετάζεται αρκετά την σύγχρονη εποχή είναι τα CAR T cells διπλής στόχευσης (dual targeting CAR T cells) γνωστά και ως dual CAR T cells. Η κατηγορία των dual CAR T cells συμπεριλαμβάνει την χορήγηση διαφορετικών CAR T cells με ξεχωριστή-μόνη εξειδίκευση και ειδικά τροποποιημένα T λεμφοκύτταρα με διπλό χαρακτήρα αντιγονικής εξειδίκευσης. Τα τελευταία, όντας διειδικά μπορούν να στοχεύσουν περισσότερα από ένα μόρια ταυτόχρονα, αναγνωρίζοντας έτσι καρκινικά κύτταρα που χαρακτηρίζονται από ετερογένεια έκφρασης του μορίου στόχου, έχοντας μπορούμε να πούμε μια εναλλακτική επιλογή στόχου και προσέγγισης για την λύση των καρκινικών κυττάρων (Shah, Maatman, Hari, & Johnson, 2019). Χαρακτηριστικά παραδείγματα στόχων σε ζεύγη για τα dual CAR T cells αποτέλεσαν τα CD19 και CD20, CD19 και CD22 μόρια τα οποία προέκυψαν ως αποτέλεσμα για αποφυγή των CD19- υποτροπών που εμφανίστηκαν σε άτομα με λευχαιμίες και λεμφώματα μετά από την χορήγηση της CD19 CAR θεραπείας (H. Dai et al., 2020; Tong et al., 2020).

Μια μελέτη παρουσίασε τα αποτελέσματα της χρησιμοποιώντας διειδικούς “tandem” anti-CD19 και anti-CD22 CARs, με 4-1BB και CD3ζ σηματοδοτική περιοχή. Πρόκειται για έκφραση δυο CARs στην ίδια χιμαιρική πρωτεΐνη μέσω χρήσης ενός μόνο ιικού φορέα. Ανάμεσα στους 12 ασθενείς που αξιολογήθηκαν μετά την χορήγηση του dual CAR προϊόντος για R/R B-ALL, παρουσιάστηκε CR με ποσοστό περίπου 92% (11/12), ενώ μόνο ένας ασθενής εμφάνισε grade 4 CRS και ICANS που αντιμετωπίστηκαν. Σε επόμενη αξιολόγηση 3/12 ασθενείς είχαν εμφανίσει υποτροπή με CD19 θετική έκφραση. Σε ένα παρόμοιο εγχείρημα, δημιουργήθηκε ένας διειδικός CAR με ταυτόχρονη στόχευση του CD19 και CD22 μορίου με CD8 hinge και TMD, 4-1BB συνδιέγερση και CD3ζ σηματοδοτικές αλυσίδες. Ο CD19-22.BB.z-CAR προερχόταν από ένα γονίδιο κωδικοποίησης anti-CD19 murine FMC63 scFv και anti-CD22 human m971 scFv μέσω ενός SIN ιικού (φακοϊού) φορέα. Ο CAR αυτός ανήκει στην κατηγορία των tandem dual CARs, σχηματίζοντας όμως μια δομή σαν λούπα (looped tandem CAR). Τα dual CAR T cells χορηγήθηκαν σε ασθενείς με B-ALL και LBCL στο πλαίσιο κλινικής μελέτης Φάσης 1. CRS εμφανίστηκε σε 29 από τους 34 ασθενείς με κατά μέσο όρο 1 ημέρα μετά την έγχυση. Grade  $\geq 3$  CRS εκδηλώθηκε σε 2 ασθενείς και ICANS σε 14 ασθενείς, 2 εξ' αυτών grade  $\geq 3$  ICANS. Παρά την αρχική απόκριση παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα των όγκων στον διειδικό CAR. Η ανθεκτικότητα σχετίστηκε με CD19<sup>+</sup> CD22<sup>+</sup> υποτροπές καθώς και CD19<sup>-lo</sup> CD22<sup>+</sup> υποτροπές κάτι που ίσως οφείλεται στην λιγότερη έκκριση κυτοκινών του CD19-22.BB.z-CAR κατά την ενεργοποίηση του από ερεθίσματα μέσω του CD22 scFv (Spiegel et al., 2021). Διειδικοί tandem CARs χρησιμοποιήθηκαν με στόχο το CD19 και CD20 σε 11 ασθενείς με R/R B-cell Non-Hodgkin lymphoma (NHL) σε κλινικές

δοκιμές φάσης I, με ORR στο 82% και 55% των ασθενών να επιτυγχάνουν CR και EFS για 1 έτος. 6 ασθενείς εκδήλωσαν grade 1-2 CRS και 3 ICANS αντίστοιχων βαθμών, χωρίς πιο σοβαρές τοξικότητες. Μερικοί ασθενείς όμως παρουσίασαν υποτροπή, η οποία όμως δεν σχετίστηκε με αρνητική ή μειωμένη έκφραση κανενός από τους δυο στόχους (Shah, Johnson, et al., 2020). Όσον αφορά το πολλαπλό μυέλωμα, στόχοι των dual tandem CAR T cells αποτέλεσαν το CD38 και προφανώς το BCMA που υπερεκφράζεται σε κακοήθη πλασμοκύτταρα του MM. Η έρευνα παρουσίασε ότι τα anti-BCMA/anti-CD38 CAR T cells με δομή CD8 HD/TMD, 4-1BB και CD3ζ σηματοδοτική περιοχή παρουσίασαν ανώτερη κυτταρολυτική δράση in vitro από τους συμβατικούς CARs μονής εξειδίκευσης σε αντίστοιχους στόχους και ισχυρή αντικαρκινική δράση in vivo σε μοντέλα ποντικών με πολλαπλό μυέλωμα. Στα πλαίσια κλινικής δοκιμής φάσης I, τα dual CAR T cells χορηγήθηκαν σε 23 ασθενείς με ανθεκτικό ή υποτροπιάζον πολλαπλό μυέλωμα. CRS εκδηλώθηκε σε 20/23 κυρίως grades 1-2 ενώ δεν παρατηρήθηκαν νευροτοξικότητες. Όμως οι αιματολογικές επιπλοκές ήταν εμφανείς με ουδετεροπενία στο 96% των ασθενών ενώ λευκοπενία στο 87%. Το 52% των ασθενών παρουσίασαν sCR (stringent complete response) δείχνοντας έτσι την αντικαρκινική δράση της θεραπείας. Παρουσιάστηκαν όμως 2 υποτροπές χωρίς αρνητική έκφραση του BCMA ή του CD38. Παρ' όλα αυτά όμως η θεραπεία παρουσίασε ισχυρή αποτελεσματικότητα (Mei et al., 2021).

Άλλη προσέγγιση στο dual targeting, διαφορετικό από τους tandem CARs, αποτελεί το προϊόν από "cotransduction", χρήση δηλαδή δυο ξεχωριστών ιικών φορέων για την μεταφορά διαφορετικών CAR γονιδίων σε T κυτταρικούς πληθυσμούς. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία 3 διαφορετικών CAR T κυτταρικών πληθυσμών ανάλογα με τις αλληλουχίες που έχουμε επιλέξει. Για παράδειγμα σε έρευνα για R/R B-ALL δημιουργήθηκαν anti-CD19, anti-CD22 και anti-CD19/anti-CD22 CAR T κυτταρικοί πληθυσμοί. Το γεγονός αυτό προέκυψε με την χρήση δυο διαφορετικών SIN lentiviral φορέων για την έκφραση CD19-specific FMC63 scFv και CD22-specific m971 scFv. Το τελικό προϊόν αποτελούνταν από 22–26% anti-CD19 CAR, 31–39% anti-CD22 CAR και τέλος το 40–44% παρουσίασαν anti-CD19 και anti-CD22 CARs. Από τους 7 ασθενείς που δέχθηκαν το προϊόν οι 5 παρουσίασαν CR μέσα σε 21 ημέρες ενώ δεν εμφανίστηκαν πάνω από grade 2 τοξικότητες.

Σε κλινική δοκιμή φάσης I μέσω ενός ιικού φορέα με 2 CAR διαγονίδια κωδικοποίησης anti-CD19 CAR με συνδιέγερση OX40 και για anti-CD22 με συνδιέγερση 4-1BB, χρησιμοποιήθηκε αυτό το "bicistronic" CAR κατασκεύασμα για παιδιατρική R/R B-ALL. Η προσέγγιση αυτή αποτελεί έκφραση δυο διαφορετικών CARs, με διαφορετική εξειδίκευση, στο ίδιο όμως T λεμφοκύτταρο. Μετά την χορήγηση σε 7 ασθενείς παρατηρήθηκε CR 100% αλλά αργότερα παρουσιάστηκε MRD σε 4 ασθενείς και 3 υποτροπές. Μια υποτροπή μάλιστα εμφάνισε CD19<sup>-</sup> CD22<sup>lo</sup> έκφραση.

Άλλη έρευνα έκανε χρήση δυο διαφορετικών CAR προϊόντων σε παιδιατρική R/R B-ALL. Αρχικά, χορηγήθηκαν anti-CD19 CAR T cells σε 20 ασθενείς και μόλις το προϊόν δεν ήταν πια ανιχνεύσιμο στο περιφερικό αίμα των ασθενών πραγματοποιήθηκε έγχυση anti-CD22 CAR T κυττάρων. Μέσος όρος χρόνου ανάμεσα στις δυο εγχύσεις των CAR προϊόντων ήταν 1.6 μήνες. Κατά την πρώτη αξιολόγηση της CD19 θεραπείας, 30 ημέρες μετά την πρώτη έγχυση, παρατηρήθηκε CR ποσοστό 100% το οποίο διήρκησε μέχρι και την έγχυση του anti-CD22 προϊόντος. Τελικά, 3 ασθενείς

παρουσίασαν υποτροπή με 2 άτομα να εμφανίζουν CD19 αρνητική έκφραση ενώ 1 άτομο, μείωση στην CD22 έκφραση. Μετά την χορήγηση του CD19 CAR προϊόντος παρουσιάστηκαν grade  $\geq 3$  CRS και ICANS ενώ με την χορήγηση και του CD22 προϊόντος μόνο grade 1-2 CRS και ICANS. Παρά τις υποτροπές, φάνηκε πως ο συνδυασμός δυο CAR θεραπειών μπορεί να είναι ένα καλό εργαλείο αποτελεσματικότητας και πρόληψης των υποτροπών αλλά πρέπει να έχουμε υπ' όψιν και τις πιθανές τοξικότητες (Pan et al., 2020).

Προσεγγίσεις ακόμα και με trivalent CAR T cells παρατηρούνται σε προκλινικά μοντέλα, μέσα από ταυτόχρονη στόχευση των τριών βασικών μορίων-στόχων σε λευχαιμίες : CD19 (FMC63 scFv), CD20 (Rituximab scFv) και CD22 (m971 scFv). Ως αποτέλεσμα δημιουργήθηκαν CD19-targeting CARs μαζί με tandem διειδικούς CD20/CD22-targeting CARs και τα ιδιαίτερα “TriCAR T cells” με τους τρεις ξεχωριστούς CARs ταυτόχρονα στην κυτταρική επιφάνεια του κάθε τροποποιημένου T λεμφοκυττάρου, με 4-1BB και CD3ζ αλυσίδες στην ενδοκυτταρική σηματοδοτική περιοχή τους. Παρουσίασαν παρόμοια επίπεδα παραγωγής IFN $\gamma$  και TNF $\alpha$  συγκριτικά με τα εξειδικευμένα anti-CD19 CAR T cells αλλά η κυτταρολυτική δράση των TriCAR T cells ήταν αρκετά ανώτερη. Τα trivalent αυτά CAR προϊόντα αξιολογήθηκαν και στο πλαίσιο της CD19 negative υποτροπής και σε CD19 knockout, μέσω CRISPR, μοντέλα, όπου και παρουσίασαν ικανοποιητική έκκριση κυτοκινών και κυτταρολυτική δράση CD19<sup>-</sup> B-ALL κυττάρων, κάτι που ίσως φανεί χρήσιμο στην αντιμετώπιση του antigen escape και τον περιορισμό υποτροπών με αρνητική έκφραση στόχου. Trivalent CAR T cells έχουν χρησιμοποιηθεί και για την θεραπεία του γλοιοβλαστώματος με στόχους: HER2, IL13R $\alpha 2$  (interleukin-13 receptor subunit alpha-2), EphA2 (ephrin-A2) μέσω ενός μοναδικού “tracistronic” διαγονιδίου. Παρατηρήθηκε έκφραση και των 3 ξεχωριστών CARs με τις αντιγονικές τους ειδικότητες και αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων που έφεραν τους παραπάνω στόχους. Χαμηλή δόση των αυτόλογων TriCAR T cells σε patient-derived xenografts παρουσίασε αντικαρκινική δράση παρά την ετερογένεια έκφρασης των στόχων από τα καρκινικά κύτταρα του γλοιοβλαστώματος κάτι που είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικό για την χρήση τέτοιων CAR T cells σε στερεούς όγκους, που όπως θα δούμε χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια έκφρασης (Bielamowicz et al., 2018).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

### **ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΑΛΛΕΣ ΔΥΣΚΟΛΙΕΣ**

Η CAR T cell θεραπεία αποτελεί μια αρκετά δραστική προσέγγιση στην αντιμετώπιση ποικίλων τύπων καρκίνου. Τα CAR T cells έχουν χαρακτηριστεί ως ένα «ζωντανό φάρμακο» και η επίδρασή τους στα καρκινικά αλλά και φυσιολογικά κύτταρα είναι αρκετά έντονη. Η περίπλοκη δομή τους και η κυτταρολυτική τους δράση σε συνδυασμό με την ελλιπή γνώση σε αρκετά σημεία που απαρτίζουν και επηρεάζουν την αποτελεσματικότητά τους προς τους όγκους και ταυτόχρονα στους υγιείς ιστούς, επιφέρουν αρκετά συχνά ανεπιθύμητες παρενέργειες (Neelapu, 2019).

### **CRS**

Το σήμα ενεργοποίησης των CAR T cells από το ερέθισμα σύνδεσης με το αντίστοιχο αντιγόνο πυροδοτεί τον πολλαπλασιασμό τους, υιοθέτηση δραστικού φαινότυπου ή φαινότυπου μνήμης, κυτταρολυτική δράση και παραγωγή κυτοκινών ως αποτέλεσμα της δραστικής λειτουργίας τους. Άλλα κύτταρα, κυρίως ανοσοκύτταρα όπως μακροφάγα καταφθάνουν στο σημείο του όγκου μέσω χημειοτακτισμού και η δράση τους φέρει ως αποτέλεσμα την παραγωγή περισσότερων κυτοκινών και άλλων χημειοκινών. Απόρροια όλων αυτών είναι το CRS ή αλλιώς Σύνδρομο Απελευθέρωσης Κυτοκινών, η πιο συνήθης και επιπλέον δυνητικά σοβαρή τοξικότητα που συνοδεύει την χρήση των CAR T cells (Sheth & Gauthier, 2021). Γενικά, το CRS εκδηλώνεται κλινικά όταν μεγάλος αριθμός λεμφοκυττάρων ή/και μυελοειδών κυττάρων ενεργοποιούνται και απελευθερώνουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Αποτελεί μια οξεία φλεγμονώδη διαδικασία που έχει άμεση σχέση με τον πολλαπλασιασμό T λεμφοκυττάρων και χαρακτηρίζεται από υπερβολικά αυξημένα επίπεδα κυτοκινών. Το CRS συνήθως εκδηλώνεται μέρες μετά την έγχυση της θεραπείας (1-14 ημέρες) στο έπακρο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των CAR T cells. Αναμονή για περισσότερο από 17 ημέρες σπάνια συνεπάγεται και εμφάνιση CRS συμπτωμάτων. Το πιο κοινό και συνήθως το πρώτο σύμπτωμα CRS που εμφανίζεται είναι ο πυρετός. Άλλα συμπτώματα συμπεριλαμβάνουν δύσπνοια, εμετό, μυαλγίες, απότομη πτώση της αρτηριακής πίεσης/υπόταση, κυτταροπενία με πτώση της αιμοσφαιρίνης, αριθμού αιμοπεταλίων, μείωση λευκοκυττάρων, ουδετεροπενία, Β απλασία με αποτέλεσμα την υπογαμμασφαιριναιμία με αναγκαία την ενδοφλέβια αναπλήρωση IgG, λοιμώξεις λόγω κυτταροπενίας, υποξία, τοξικότητες σε όργανα και οργανικές ανεπάρκειες με θανατηφόρες επιπτώσεις (Frey & Porter, 2019).

### **Πρόληψη και διαχείριση CRS**

Το CRS περιλαμβάνει αυξημένα επίπεδα C-reactive protein (CRP), IFN $\gamma$ , ιντερλευκίνες όπως IL-1, IL-2, sIL2Ra (διαλυτός υποδοχέας IL-2), IL-4, IL-6, IL-8 και IL-10, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), granzyme B και TNF $\alpha$ . Φαίνεται ξεκάθαρα δηλαδή, η άμεση σχέση του CRS με τις προφλεγμονώδεις ιδιότητες των κυτοκινών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προσελκύει η IL-6 ως κύριος συντελεστής στην εμφάνιση του CRS. Η IL-6 εκκρίνεται από τα T λεμφοκύτταρα και σε μεγάλες ποσότητες από τα μακροφάγα στο έπακρο του πολλαπλασιασμού των CAR T cells και διαδραματίζει ίσως τον πιο σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση CRS καθώς υψηλά επίπεδα IL-6 πιθανόν να ενεργοποιούν έναν προφλεγμονώδη καταρράκτη κυτοκινών. Φαίνεται επιπλέον ότι η IL-6 που παράγεται ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των CAR T cells ωθεί την έκκριση ακόμα περισσότερης IL-6 από μονοκύτταρα μακροφάγα. Η χρήση του φαρμάκου tocilizumab για την θεραπεία φλεγμονωδών καταστάσεων όπως η νεανική αρθρίτιδα μπλοκάρει την δράση της IL-6 στοχεύοντας τους διαλυτούς και διαμεμβρανικούς υποδοχείς της IL-6 (sIL6R και mIL6R), έχει δείξει ότι η στόχευση της IL-6 οδηγεί σε υποχώρηση της σοβαρότητας του CRS. Σε μερικές περιπτώσεις ακόμα, έχει δείξει άμεση αναστροφή του CRS. Έτσι, η χρήση του αποκλεισμού της IL-6R έχει γίνει γενικά αποδεκτή ως θεραπεία πρώτης γραμμής για σοβαρό CRS μετά από χορήγηση CAR T cells (Brudno & Kochenderfer, 2019; Frey & Porter, 2019). Ένα αρνητικό του tocilizumab όμως, καθώς δεσμεύει τους υποδοχείς της IL-6 και όχι την ίδια, είναι ότι δεν περιορίζει τα επίπεδά της στον ορό του αίματος, κάτι που μπορεί να προκαλέσει σοβαρές νευροτοξικότητες από την IL-6 διαπερνώντας τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Σε



ασθενείς που δεν αποκρίνονται στην αγωγή με tocilizumab, συνιστάται θεραπεία μονοκλωνικών αντισωμάτων με στόχο την IL-6, Siltuximab (Frey & Porter, 2019; Kang et al., 2020; Kotch, Barrett, & Teachey, 2019). Knockdown της IL-6 έδειξε να μειώνει αισθητά και την παραγωγή IL-6 στα μονοκύτταρα μακροφάγα. Επιπλέον μέσα από την μείωσή της, φάνηκε ότι η δράση της IL-6 δεν έχει ιδιαίτερη επίδραση στην αποτελεσματικότητα των CAR T cells (Kang et al., 2020). Για τον λόγο αυτόν υπέθεσαν ότι CAR T cells με ιδιαίτερα μεγάλο βαθμό πολλαπλασιασμού in vivo θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν, μέσω έκκρισης ανταγωνιστικών κυτοκινών, για το μπλοκάρισμα της δράσης της IL-6 και IL-1. Δημιουργήθηκαν έτσι anti-CD19 και anti-BCMA CARs που ταυτόχρονα εκφράζουν anti-IL6 scFv (aIL6) και IL1RA για το μπλοκάρισμα των παραπάνω κυτοκινών και την μείωση του σχετιζόμενου CRS. Τα CART-aIL6/IL1RA, όπως ονομάστηκαν, φάνηκαν αποτελεσματικά σε μοντέλα ποντικών αλλά και σε 18 άτομα με CLL, ALL και MM, μειώνοντας την IL-6, μπλοκάροντας την δράση της IL-1 και περιόρισαν την εμφάνιση CRS και νευροτοξικότητων που σχετίζονται με την δράση των CAR T cells (Xue et al., 2021). Και άλλες προσπάθειες CAR προέλευσης έχουν καταγραφεί με στόχευση κυτοκινών για τον περιορισμό του CRS. Anti-CD19 mIL1RA CAR T cells χρησιμοποιήθηκαν αποτελεσματικά στην μείωση της σοβαρότητας CRS, αποφεύγοντας τις θνησιμότητες, περιορίζοντας παράλληλα κυτοκίνες μακροφάγων που σχετίζονται με CRS, υποστηρίζοντας περισσότερο την ιδέα περιορισμού του CRS χωρίς την ανάγκη παρέμβασης εξωγενούς προέλευσης. Βλέπουμε πάλι ότι η στόχευση της IL-1 που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση CRS αποδίδει, μειώνοντας την σοβαρότητα των συμπτωμάτων. Επιπλέον, δεν παρουσιάστηκε επίδραση στα επίπεδα κυτοκινών, στον ορό του αίματος, που έχουν σχέση με την κυτταρολυτική δράση των CAR T cells, διατηρώντας έτσι την αντικαρκινική τους δράση άθικτη. Παράλληλα πρέπει να διαπιστωθεί η σημαντικότητα της IL-6 και IL-1 που παράγονται από τα μακροφάγα κατά την δράση τους πάνω στον όγκο, καθώς φαίνεται να είναι οι κύριοι συντελεστές της παθοφυσιολογίας του CRS και της εκδήλωσης σοβαρών συμπτωμάτων από την χρήση των CAR T cells (Giannidis et al., 2018; Hao, Li, Meng, Han, & Hong, 2020). Στοιχεία από μια έρευνα έδειξαν ότι το μπλοκάρισμα της IL-1β και του TNFα μπορεί να επιφέρει θετικά αποτελέσματα στον περιορισμό των CRS και νευροτοξικότητων μετά την έγχυση της CAR T θεραπείας (Chen et al., 2021). Επιπλέον, η προσέγγιση με κορτικοστεροειδή έχει δείξει ότι μπορεί να αντιμετωπίσει τοξικότητες που σχετίζονται με το CRS, αλλά η δράση τους εικάζεται ότι μπορεί να επιδράσει αρνητικά πάνω στην αποτελεσματικότητα των CAR T cells και την αντικαρκινική τους δράση. Μετά την έγχυση των CAR T cells, χρήση υψηλής δόσης κορτικοστεροειδών για πάνω από 14 μέρες έχει παρουσιάσει μείωση της αποτελεσματικότητας δρώντας αρνητικά στην αντικαρκινική τους ισχύ. Για τον λόγο αυτό η χρήση κορτικοστεροειδών απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή και μέχρι τώρα χορηγούνται όταν το tocilizumab δεν φέρνει τα επιθυμητά αποτελέσματα στον περιορισμό του CRS (Brudno & Kochenderfer, 2019).

### **Συστήματα βαθμολόγησης CRS**

Η συμπτωματολογία αυτή, μεγάλου εύρους, που ακολουθεί την εκδήλωση του CRS με κλινικά συμπτώματα ήπιας μορφής και μικρής επικινδυνότητας μέχρι και θανατηφόρα επεισόδια με πολυσυστηματική οργανική ανεπάρκεια, μαρτυρά την αναγκαιότητα ύπαρξης συστημάτων αξιολόγησης και βαθμονόμησης του CRS ανάλογα με την

σοβαρότητα των συμπτωμάτων, γνωστά ως CRS grading systems. Το αρχικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από την κλίμακα CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) του National Cancer Institute με Grades από 1 έως 5, αυξανόμενης σοβαρότητας και επικινδυνότητας: Grade 1:mild, Grade 2:moderate, Grade 3:severe (not immediately life threatening), Grade 4:life threatening, Grade 5:death related to AE (Freites-Martinez, Santana, Arias-Santiago, & Viera, 2021; Porter, Frey, Wood, Weng, & Grupp, 2018). Αυτό το σύστημα ταξινόμησης όμως παρουσιάζεται να μην είναι αρκετά ικανοποιητικό για ανοσο/κυτταρικές θεραπείες καθώς είχε δημιουργηθεί πριν την κατανόηση της εκδήλωσης του CRS και την συσχέτιση του με την χρήση των CAR T cells σε διάφορα είδη όγκων. Το CTCAE v4.0 σύστημα αναφέρει και χαρακτηρίζει την αναμενόμενη εκδήλωση των CRS συμπτωμάτων αμέσως μετά την έγχυση της θεραπείας στον ασθενή, μέσα στα πρώτα λεπτά ή και μερικές ώρες, παραβλέποντας την πιθανότητα καθυστερημένης εμφάνισης συμπτωμάτων CRS, γεγονός που είναι πιο συναφές στην περίπτωση της CAR T cell θεραπείας. Γενικά, το CRS κάνει την εμφάνισή του τις μέρες που ακολουθούν την έγχυση των CAR T cells, από την 1<sup>η</sup> έως και την 14<sup>η</sup> ημέρα, άρα και η ταξινόμηση των CRS συμπτωμάτων δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως αντιπροσωπευτική σε αυτήν την περίπτωση. Ένα επιπλέον αρνητικό στοιχείο του CTCEA συστήματος ταξινόμησης είναι ότι θεωρεί ότι τα συμπτώματα από CRS μπορούν να υποχωρήσουν με την διακοπή της φαρμάκου, κάτι που δεν γίνεται να ισχύσει στην περίπτωση των CAR T cells καθώς η χορήγησή τους πραγματοποιείται σε μια μεμονωμένη έγχυση και ο πολλαπλασιασμός τους in vivo χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα μεγάλο βαθμό (D. W. Lee et al., 2019; Porter et al., 2018). Για τον λόγο αυτό προέκυψε η ανάγκη ύπαρξης νέων συστημάτων με χαρακτηριστική την δημιουργία ενός νέου CRS grading system από το University of Pennsylvania. Το Penn grading scale με την χρήση της θεραπείας της Novartis, tisagenlecleucel, με anti-CD19 CAR T cells, δημιούργησε ένα νέο CRS grading system προσαρμοσμένο στην μεθοδολογία και τις ιδιότητες της CAR T cell θεραπείας, μέσα από εύκολα προσβάσιμα κλινικά στοιχεία, διαχωρίζοντας παράλληλα τα CRS συμπτώματα που εκδηλώνονται αμέσως μετά την έγχυση καθώς και συμπτώματα που εμφανίζονται με καθυστέρηση. Τα grades διαχωρίζονται με βάση την εμφάνιση υπότασης και υποξίας. Ως Grade 1 ορίζεται μια ήπια αντίδραση που απαιτεί υποστηρικτική ιατρική φροντίδα μέσω αντιπυρετικών και αντιεμετικών. Ασθενείς με grade 2 CRS παρουσιάζουν μερικά δείγματα δυσλειτουργίας οργάνων. Χρειάζεται νοσοκομειακή περίθαλψη για αντιμετώπιση CRS συμπτωμάτων όπως πυρετός με ουδετεροπενία ή ενδοφλέβιες θεραπείες. CRS grade 3 χαρακτηρίζεται ως πιο σοβαρή αντίδραση που χρήζει άμεσης νοσοκομειακής περίθαλψης για σοβαρή δυσλειτουργία οργάνων, αντιμετώπιση υπότασης μέσω ενδοφλέβιας χορήγησης μικρής δόσης αγγειοσυσταλτικής αγωγής για την αύξηση της αρτηριακής πίεσης και αντιμετώπιση περιστατικών υποξίας με υποστήριξη οξυγόνου. Το επικίνδυνο για την ζωή του ασθενούς grade 4 CRS παρουσιάζει σοβαρή υπόταση και υποξία που απαιτούν υψηλή δόση αγγειοσυσταλτικών (μονοθεραπεία με κατεχολαμίνες όπως νορεπινεφρίνη και ντοπαμίνη) και μηχανική υποστήριξη αναπνοής (Porter et al., 2018). Παρόμοια μπορεί να χρησιμοποιηθεί και το Lee grading system με βαθμούς CRS από 1 έως 4, αυξανόμενης σοβαρότητας και ανάγκης για ιατρική παρέμβαση με συμπτώματα από πυρετό έως και οργανικές ανεπάρκειες οριοθετώντας τα grades με μεγαλύτερη προσοχή σε τοξικότητες κάθε όργανο ξεχωριστά παρέχοντας μια νέα εναλλακτική στην ταξινόμηση των CRS (D. W. Lee et al., 2019).

CRS Parameter	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
Fever	Temperature $\geq 38^{\circ}\text{C}$	Temperature $\geq 38^{\circ}\text{C}$	Temperature $\geq 38^{\circ}\text{C}$	Temperature $\geq 38^{\circ}\text{C}$
With				
Hypotension	None	Not requiring vasopressors	Requiring one vasopressor with or without vasopressin	Requiring multiple vasopressors (excluding vasopressin)
And/or*				
Hypoxia	None	Requiring low-flow nasal cannula or blow-by	Requiring high-flow nasal cannula, facemask, nonbreather mask, or Venturi mask	Requiring positive pressure (e.g., CPAP, BiPAP, intubation and mechanical ventilation)

Abbreviations: ASBMT, American Society of Blood and Marrow Transplantation; BiPAP, bilevel positive airway pressure; CPAP, continuous positive airway pressure; CRS, cytokine release syndrome.

\*CRS grade is determined by the more severe event: hypotension or hypoxia not attributable to any other cause.

**Εικόνα 7:** Σύστημα βαθμολόγησης συνδρόμου απελευθέρωσης κυτοκινών (CRS) που σχετίζεται με την CAR T θεραπεία. Grades 1-4 με αυξανόμενη σοβαρότητα συμπτωμάτων και παροχή περίθαλψης (Santomasso, Bachier, Westin, Rezvani, & Shpall, 2019)

Οι παρακάτω δημοσιεύσεις παραθέτουν κριτήρια διαχωρισμού του σοβαρού CRS (sCRS), που απαιτεί άμεση παροχή ιατρικής φροντίδας, από τις πιο ήπιες μορφές του CRS. Το εγχείρημα αυτό πραγματοποιήθηκε με την χορήγηση CD19-specific CD28/CD3ζ CAR T cells σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες B κυττάρων στο Memorial Sloan Kettering Cancer Center, καταγραφή της κλινικής τους εικόνας και καταμέτρηση στα επίπεδα κυτοκινών σχετιζόμενες με το CRS στον ορό του αίματός τους πριν και μετά την χορήγηση της θεραπείας. Τα κριτήρια αυτά δημιουργήθηκαν με σκοπό την αποφυγή της πρώιμης/βιαστικής παρέμβασης στην περίπτωση πιο ήπιων περιστατικών εκδήλωσης CRS, κάτι που θα μπορούσε να επηρεάσει σημαντικά την persistence και αποτελεσματικότητα της CAR T cell θεραπείας. Τα κριτήρια βασίστηκαν στην κλινική εικόνα των ασθενών που παρουσίασαν τουλάχιστον ένα από τα παρακάτω σοβαρά CRS συμπτώματα: υπόταση, υποξία και νευρολογικές αλλαγές. Με βάση τα κλινικά δείγματα και τα επίπεδα κυτοκινών όρισαν ως sCRS σε ασθενείς με επίμονο πυρετό  $38^{\circ}\text{C}$  για περισσότερες από 3 ημέρες, αυξημένα επίπεδα σε συγκεκριμένες κυτοκίνες (2 κυτοκίνες: αυξημένα επίπεδα κατά 75 φορές/1 κυτοκίνη: αυξημένα επίπεδα κατά 250 φορές τουλάχιστον) και κλινικές ενδείξεις τοξικότητας όπως υπόταση με αναγκαία χρήση ενός τουλάχιστον αγγειοσυσταλτικού, ή υποξία με κορεσμό οξυγόνου  $<90\%$  καθώς και νευρολογικές διαταραχές συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών της ψυχικής κατάστασης και επιληπτικών κρίσεων (Davila et al., 2014; J. H. Park et al., 2018). Φαίνεται να υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ εκδήλωσης CRS και της απόκρισης του ασθενούς στην θεραπεία. Τα άτομα που δεν εκδηλώνουν CRS είναι πιο πιθανόν να μην παρουσιάσουν ωφέλιμα αποτελέσματα μετά την έγχυση των CAR T cells. Αντίθετα, τα άτομα που αποκρίνονται καλύτερα στην θεραπεία φαίνεται να είναι και αυτά που εμφανίζουν CRS, αλλά μια καλή/ισχυρή απόκριση δεν συνεπάγεται και πιο σοβαρή CRS, παρά μόνο αύξηση πιθανότητας εμφάνισης CRS. Το μόνο μέσο/δείκτης πρόβλεψης της σοβαρότητας CRS που διαθέτουμε μέχρι τώρα, αποτελεί το καρκινικό φορτίο του ασθενούς κατά την έγχυση, με υψηλό καρκινικό φορτίο να οδηγεί πιο συχνά σε υψηλότερα CRS grades (Zahid, Siegler, & Kenderian, 2020). Βέβαια και η χρήση της CRP μπορεί να βοηθήσει στην πρόγνωση σοβαρών περιστατικών CRS.  $\text{CRP} > 20\text{mg/dl}$  σχετίζεται με σοβαρές εκδηλώσεις CRS, οπότε τα επίπεδα της CRP μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικός δείκτης σοβαρών συμπτωμάτων CRS (Brudno & Kochenderfer, 2019; Greenbaum et al., 2021). Τέλος φαίνεται να υπάρχει και συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των CAR T cells κατά την

έγχυση στον ασθενή. Η χορήγηση  $10^{10}$  CAR T cells σε ασθενή οδήγησε σε σοβαρό CRS με θανατηφόρα αποτελέσματα υποδεικνύοντας ότι και αυτή η παράμετρος παίζει ρόλο στο CRS (R. A. Morgan et al., 2010).

### **HLH/MAS**

Οι κλινικές και εργαστηριακές ενδείξεις του σοβαρού CRS παρουσιάζουν κοινό χαρακτήρα στο προφίλ των κυτοκινών με την Αιμοφαγοκυτταρική λεμφοϊστοκυττάρωση (HLH) και το Σύνδρομο Ενεργοποίησης Μακροφάγων (MAS). Το CRS, όπως είδαμε, χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα IFN- $\gamma$ , η κυτοκίνη με κυρίως προφλεγμονώδεις ιδιότητες που συντελούν στην ανοσολογική απόκριση, ενεργοποίηση μακροφάγων και παίζουν ρόλο στην αποτελεσματικότητα των CAR T cells. Η αυξημένη IFN- $\gamma$  εικάζεται ότι μπορεί να πυροδοτεί και την δευτερογενή εκδήλωση HLH/MAS ως αποτέλεσμα του CRS, με συμπτώματα όπως υπερφερριτιναιμία (10.000 ng/mL), ηπατομεγαλία και σπληνομεγαλία. Η εμφάνιση HLH/MAS ως δευτερογενείς επιπλοκές του CRS από την χρήση των CAR T cells είναι σπάνια και εκδηλώνεται σε περίπου 1% των ατόμων που λαμβάνουν την θεραπεία, αλλά σχετίζονται με σοβαρές επιπτώσεις και θανατηφόρα επεισόδια (Major et al., 2021; Martín-Rojas et al., 2022; Peterlin et al., 2022). Παράδειγμα: Σε άνδρα 34 ετών με DLBCL, χορηγήθηκαν anti-CD19 CAR T cells (tisagenlecleucel) και παρουσίασε grade 1 CRS στην Lee κλίμακα με επίμονο πυρετό (day +1), ο οποίος είχε ξεκινήσει όμως και από την διαδικασία της χημειοθεραπείας με κυκλοφωσφαμίδη (lymphodepletion) που είχε δεχθεί ο ασθενής πριν την έγχυση των CAR T cells. Η παρουσία υψηλού πυρετού σχετίστηκε με υπερφερριτιναιμία με peak επίπεδα φερριτίνης 50.000 ng/ml (day +23) και σοβαρή κυτταροπενία με επίπεδα αιμοσφαιρίνης < 8g/dl, αιμοπετάλια 15.000/μl και άμεση ανάγκη έγχυσης. Παρουσίασε δείγματα δυσλειτουργίας στο ήπαρ, υψηλά επίπεδα IL-6 και εξετάστηκε για HLH/MAS όπου και διαγνώστηκε αιμοφαγοκυττάρωση. Ακολούθησε μια σειρά φαρμάκων με Tocilizumab και χορήγηση υψηλής δόσης κορτικοστεροειδών (day +22) με αποτέλεσμα την πτώση του πυρετού αλλά παρουσιάστηκε πάλι εμπύρετη κατάσταση την 34<sup>η</sup> ημέρα. Την 26<sup>η</sup> ημέρα χορηγήθηκε Siltuximab με πτώση των επιπέδων IL-6 και Anakinra χωρίς αποτέλεσμα. Επιπλέον, έγινε χρήση κυκλοφωσφαμίδης σε συνεργασία με αιμοπροσρόφηση χωρίς πάλι κάποιο αποτέλεσμα. Παρουσιάστηκε σοβαρή ηπατική δυσλειτουργία και επήλθε θάνατος την 36<sup>η</sup> ημέρα από πολυσυστημική οργανική ανεπάρκεια. Συνοψίζοντας, το HLH/MAS που σχετίζεται με τα CAR T cells είναι μια ασυνήθιστη εκδήλωση σοβαρού CRS ως επιπλοκή της θεραπείας, με δύσκολη πρόγνωση και διάγνωση και σχετίζεται με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Η έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση καθώς και ο διαχωρισμός CRS συμπτωμάτων από HLH/MAS επιπλοκές με τα κατάλληλα διαγνωστικά κριτήρια κρίνεται απαραίτητος για την αποφυγή παρενεργειών που βάζουν σε σοβαρό κίνδυνο την ακεραιότητα των ασθενών (Martín-Rojas et al., 2022).

### **ICANS νευροτοξικότητες**

Άλλες σοβαρές παρενέργειες που σχετίζονται με την χορήγηση της CAR T θεραπείας είναι οι νευροτοξικότητες. Στην βιβλιογραφία, οι νευροτοξικότητες, γνωστές και ως ICANS (immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome) που ακολουθούν την CAR T cell θεραπεία, αναφέρονται σε ποσοστά που φτάνουν περίπου το 65% των ασθενών για αιματολογικές κακοήθειες. Οι αναφορές προέρχονται κυρίως από την

χρήση των anti-CD19 CAR T cells, καθώς είναι τα πιο διαδεδομένα και μελετημένα για την αντιμετώπιση αιματολογικών κακοηθειών των B κυττάρων. Σε παλιότερες έρευνες εικαζόταν ότι οι νευροτοξικότητες αφορούσαν μόνο την CD19 CAR T θεραπεία αλλά πια υπάρχουν αναφορές ακόμα και για θανατηφόρες επιπλοκές με ICANS και σε άλλες CAR T προσεγγίσεις ακόμα και σε στερέους όγκους. Οι ICANS όπως φαίνεται μπορεί να εκδηλώνονται με συμπτώματα μη ειδικά και ευρέως φάσματος αλλά και με σοβαρότερες μορφές με συμπτώματα που μπορεί να οδηγήσουν ακόμα και σε θάνατο (Neelapu, 2019; Schubert et al., 2021; Sheth & Gauthier, 2021). Η Αμερικάνικη Εταιρεία Μεταμοσχεύσεων και Κυτταρικής Θεραπείας (ASTCT) ορίζει τις ICANS νευροτοξικότητες ως διαταραχές που χαρακτηρίζονται από παθολογικές διαδικασίες που αφορούν το κεντρικό νευρικό σύστημα μετά από ανοσοθεραπεία, που έχει ως αποτέλεσμα την εμπλοκή ή ενεργοποίηση ενδογενών ή εγχυόμενων T λεμφοκυττάρων ή και άλλων ανοσοκυττάρων. Τα συμπτώματα που εκδηλώνονται μπορεί να είναι προοδευτικά και περιλαμβάνουν αφασία, αλλοιωμένο επίπεδο συνείδησης, μειωμένες γνωστικές δεξιότητες, κινητική αδυναμία, επιληπτικές κρίσεις και εγκεφαλικό οίδημα. Άλλα συμπτώματα περιλαμβάνουν σύγχυση, παραλήρημα, πονοκέφαλος, τρέμουλο, παραισθήσεις, κατάθλιψη, επιληπτικές κρίσεις, αφασία, διαταραχή λόγου εγκεφαλοπάθεια, εγκεφαλικό οίδημα και κώμα (D. W. Lee et al., 2019).

### **Εύρος συμπτωμάτων και ταξινόμηση ICANS**

Οι νευροτοξικότητες παρουσιάζονται συνήθως εντός του πρώτου μήνα μετά την έγχυση των CAR T cells στον ασθενή, με διάμεσο τις 6 ημέρες. Σπανίως όμως, η εμφάνιση τους μπορεί να έρθει και καθυστερημένα, μήνες μετά την χορήγηση του CAR προϊόντος. Τα συμπτώματα κορυφώνονται την 7<sup>η</sup> με 8<sup>η</sup> ημέρα και διαρκούν συνήθως 2-9 ημέρες, με τα πιο ήπια εξαφανίζονται χωρίς να απαιτούν ειδική παρέμβαση. Ωστόσο μπορεί να παρουσιάσουν και πολύ μεγαλύτερη διάρκεια, με αναγκαία την συνεχή παρακολούθηση και παροχή φροντίδας. Συμπτώματα όπως το τρέμουλο και η κεφαλαλγία θεωρούνται μη ειδικά οπότε και δεν συμπεριλαμβάνονται στα διαγνωστικά συμπτώματα των ICANS. Παρ' όλα αυτά προηγούνται ή συνυπάρχουν της πιο οριστικής νευρολογικής βλάβης. Όπως φαίνεται από τα πιο ανησυχητικά συμπτώματα νευροτοξικότητας αποτελεί το εγκεφαλικό οίδημα που σχετίζεται με τις περισσότερες θνησιμότητες. Γενικά, τα συμπτώματα ποικίλουν ως προς την σοβαρότητα τους και ταξινομούνται με το ICE scoring system (10-pt ICE) βαθμολογώντας τα βάση της αυξανόμενης σοβαρότητας.

ICE:10, καμία βλάβη

ICE:6-9, grade 1 ICANS

ICE:3-5, grade 2 ICANS

ICE:0-2, grade 3 ICANS

ICE:0, grade 4 ICANS

\*ICE Immune Effector Cell-associated Encephalopathy

Η βαθμολόγηση των ICANS απαιτεί αξιολόγηση με ICE system καθώς και αξιολόγηση σε άλλους νευρολογικούς τομείς, όπως το επίπεδο συνείδησης, κινητικά συμπτώματα,

επιληπτικές κρίσεις και αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση/εγκεφαλικό οίδημα, που μπορεί να εμφανιστούν με ή χωρίς εγκεφαλοπάθεια (D. W. Lee et al., 2019).

Neurotoxicity Domain	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
ICE score	7-9	3-6	0-2	0 (patient is unarousable and unable to perform ICE)
Depressed level of consciousness	Awakens spontaneously	Awakens to voice	Awakens only to tactile stimulus	Patient is unarousable or requires vigorous or repetitive tactile stimuli to arouse; stupor or coma
Seizure	NA	NA	Any clinical seizure focal or generalized that resolves rapidly; or nonconvulsive seizures on EEG that resolve with intervention	Life-threatening prolonged seizure (> 5 min); or repetitive clinical or electrical seizures without return to baseline in between
Motor findings	NA	NA	NA	Deep focal motor weakness such as hemiparesis or paraparesis
Raised ICP/cerebral edema	NA	NA	Focal/local edema with or without hemorrhage on neuroimaging	Diffuse cerebral edema on neuroimaging; decerebrate or decorticate posturing; or cranial nerve VI palsy; or papilledema; or Cushing triad

Abbreviations: ASBMT, American Society of Blood and Marrow Transplantation; EEG, electroencephalogram; ICANS, immune effector cell-associated neurologic syndrome; ICE, Immune Effector Cell Encephalopathy screening tool; ICP, intracranial pressure; NA, not applicable.

**Εικόνα 8:** Σύστημα βαθμολόγησης νευροτοξικότητας (ICANS) που σχετίζονται με την CAR T θεραπεία. Grades 1-4 και ICE score ανάλογα με την σοβαρότητα των συμπτωμάτων (Santomasso et al., 2019)

Grade 1 ICANS, ICE:7-9 Ασθενείς με grade 1 ICANS μπορεί να έχουν καθυστερημένη ανταπόκριση, αποπροσανατολισμό (χρόνος/τόπος), δυσκολία στην συγκέντρωση, δυσκολία αντίστροφης μέτρησης, αλλοιωμένο γραφικό χαρακτήρα (από τα πρώτα τεστ για ICANS). Μπορεί να υπάρχει υπνηλία όμως ο ασθενής ξυπνάει αυθόρμητα και όταν του ζητηθεί να μπορέσει να ολοκληρώσει το μεγαλύτερο μέρος της ICE αξιολόγησης. Συν-εμφάνιση με CRS και παροδικά εμπύρετα επεισόδια (D. W. Lee et al., 2019).

Grade 2 ICANS, ICE:3-6 Ασθενείς με grade 2 ICANS εμφανίζουν συχνά εκφραστική αφασία, περιορισμένη ικανότητα αυθόρμητης επικοινωνίας. Μπορεί να έχουν δυσκολία στο να γράψουν μια τυπική πρόταση λόγω κακής γραφής και απραξίας. Δυσκολεύονται να ονοματίσουν αντικείμενα λόγω εκφραστικής αφασίας ή/και δυσκολία να ακολουθήσουν εντολές λόγω κακής συγκέντρωσης. Η εκφραστική αφασία είναι το πρώτο ειδικό σημάδι σοβαρής νευροτοξικότητας. Τα πρώτα σημάδια στο grade 2 περιλαμβάνουν παραγωγή ακουσίων συλλαβών και λέξεων ή και επανάληψη ιδίων λέξεων. Διαθέτουν ικανότητα επικοινωνίας για τις ανάγκες τους αλλά μειωμένο επίπεδο συνείδησης. Ανταποκρίνονται στην φωνή αλλά η απόκριση μπορεί να είναι καθυστερημένη (D. W. Lee et al., 2019).

Grade 3 ICANS, ICE:0-2 Ασθενείς με grade 3 ICANS έχουν σοβαρή αφασία. Δεν ομιλούν ή δεν μπορούν να ακολουθήσουν εντολές (μπορεί να μην έχουν την δυνατότητα να απαντήσουν στις ερωτήσεις ICE). Εναλλακτικά, μπορεί να παρουσιάζουν υπερβολική υπνηλία και να απαιτείται απτικό ερέθισμα για να παρακολουθήσουν τον εξεταστή. Οποιοδήποτε είδος επιληπτικών κρίσεων πληροί τα κριτήρια για grade 3 ICANS. Οίδημα (focal/local) στην νευροαπεικόνιση κατατάσσεται σε grade 3 ICANS (D. W. Lee et al., 2019).

Grade 4 ICANS Ασθενείς με ICE score 0 καθώς δεν ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα ή αδυνατούν να πραγματοποιήσουν την αξιολόγηση ICE. Παρατηρείται λήθαργος

(ανταπόκριση με μορφασμούς ή απαιτεί επαναλαμβανόμενα απτικά ερεθίσματα) ή κωματώδης κατάσταση (μηδενική ανταπόκριση). Αυτό το μειωμένο επίπεδο συνείδησης δεν πρέπει να μπορεί να αποδοθεί σε καμία άλλη αιτία (π.χ. θεραπευτική αγωγή). Υπάρχει πιθανότητα διασωλήνωσης. Παρατηρούνται επικίνδυνες παρατεταμένες επιληπτικές κρίσεις (>5min), έντονη κινητική αδυναμία όπως ημιπάρεση. Συμπτώματα και ενδείξεις αυξημένης ενδοκρανιακής πίεσης, με εμετό και κεφαλαλγία, πάρεση κρανιακού VI νεύρου, Cushing's triad και διάχυτο εγκεφαλικό οίδημα (D. W. Lee et al., 2019).

Grade 5 ICANS Ορίζεται ο θάνατος λόγω ICANS χωρίς κάποιος άλλος παράγοντας να οφείλεται στο αποτέλεσμα αυτό (D. W. Lee et al., 2019).

### **Αίτια και Παράγοντες εκδήλωσης ICANS**

ICANS μπορεί να εκδηλώνονται με ή χωρίς CRS και παρατηρείται μια γενική τάση εκδήλωσης τους που σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα κυτοκινών. Οι IL-1, IL-6, IL-15 και GM-CSF είναι μερικές από τις κυτοκίνες που εικάζεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις ICANS. Τα επίπεδα κυτοκινών και η σοβαρότητα CRS αποτελούν τους κύριους παράγοντες εκδήλωσης ICANS. Η συσχέτιση αυτή έχει δειχθεί σε πολλές κλινικές μελέτες, σε παιδιά και ενήλικες, με CAR T cells 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> γενιάς με CD28 ή/και 4-1BB συνδιέγερση, για αιματολογικές κακοήθειες B κυττάρων (λευχαιμίες και λεμφώματα). Μελέτες με μικρότερα ποσοστά CRS παρουσίασαν και μικρότερα ποσοστά ICANS (Gust, Ponce, Liles, Garden, & Turtle, 2020; Neelapu, 2019). Παρ' όλα αυτά μερικές μελέτες είχαν πολύ μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό ICANS σε σχέση με το CRS. Οι μεγάλες αποκλίσεις στα αποτελέσματα ίσως εξηγούνται από την χρήση διαφορετικών κλιμάκων βαθμολόγησης που χρησιμοποιήθηκαν, με τις περισσότερες από τις CAR T cells κλινικές μελέτες να χρησιμοποιούν CTCAE κριτήρια τοξικότητας, ενώ πιο πρόσφατες μελέτες χρησιμοποιούν το ASTCT ICANS grading σύστημα (D. W. Lee et al., 2019). Για την αξιολόγηση της άμεσης επίδρασης των CAR T cells στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα πραγματοποιείται η καταμέτρηση τους στο Εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) μετά την χορήγηση τους και η αξιολόγηση του ΚΝΣ ατόμων με λευχαιμία που παρουσίασαν νευρολογικές επιπλοκές. Σύγχρονες μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα IL-6 καθώς και ο αριθμός των συνολικών CAR T cells στο CFS, σχετίζονται με εκδήλωση νευροτοξικότητας. Άλλη έρευνα έδειξε αυξημένα επίπεδα των CAR T cells στο CFS ατόμων με νευροτοξικότητες συμπληρώνοντας τα παραπάνω ευρήματα. 6/21 ασθενείς που παρουσίασαν νευροτοξικότητες είχαν και μεγαλύτερο αριθμό CAR T cells που είχαν διεισδύσει στο CFS (Gust et al., 2020). Όμως, κοινή παθοφυσιολογία με ίδια συμπτώματα φαίνεται να προκαλεί στους ασθενείς και η bispecific T cell engager (BiTE) ανοσοθεραπεία με blinatumomab, με την διαφορά ότι εδώ το CRS δεν αυξάνει το ρίσκο εμφάνισης ICANS (Subklewe, 2021). Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την ανεπιθύμητη εμφάνιση των ICANS αποτελούν οι προυπάρχουσες κλινικές ενδείξεις νευρολογικής νοσηρότητας και φυσικά το είδος του όγκου. Οι προηγούμενες αγωγές σε συνδυασμό με την CAR T θεραπεία ειδικά σε ανθεκτικές και υποτροπιάζουσες μορφές καρκίνου μπορεί να δυσχεραίνουν την κατάσταση του ασθενούς και να συντελέσουν στην εμφάνιση σοβαρών περιστατικών νευροτοξικότητας (Morris, Neelapu, Giannidis, & Sadelain, 2022). Προηγουμένως φάνηκε πως ο αριθμός των CAR T cells σχετίζεται με τις τοξικότητες (R. A. Morgan et al., 2010). Βέβαια και η ίδια η δομή του CAR μπορεί να επιδράσει αρνητικά σε αυτό

το θέμα. High-affinity anti-GD2 CAR T cells για νευροβλώστωμα, οδήγησαν σε θανατηφόρο περιστατικό εγκεφαλοπάθειας (Richman et al., 2018). Επιπλέον εικάζεται ότι ο σχηματισμός ετεροδιμερών της CD28 διαμεμβρανικής περιοχής του CAR με το ενδογενές CD28 του T λεμφοκυττάρου, μπορεί να σχετίζονται με νευροτοξικότητες σε anti-CD19 θεραπείες (Muller et al., 2021). Κλινική μελέτη για τον καρκίνο του προστάτη στην Φάση 1, παρουσίασε στοιχεία με τον θάνατο ασθενούς από σοβαρά περιστατικά ICANS. Η προσέγγιση αποτελούσε την στόχευση του PSMA TAA και συνέκφραση dominant negative TGF- $\beta$ . Το TGF- $\beta$  εκφράζεται στον καρκίνο του προστάτη ως ανοσοκατασταλτικός παράγοντας, οπότε σκοπός ήταν να καταστείλουν τις ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες του καρκίνου του προστάτη και να καταστρέψουν τα PSMA<sup>+</sup> καρκινικά κύτταρα (Narayan et al., 2022).

### **Αντιμετώπιση ICANS**

Οι περισσότερες περιπτώσεις ICANS που προκύπτουν ως παρενέργειες της χρήσης των CAR T cells εμφανίζονται ως ήπιες, αναστρέψιμες ή αυτοπεριοριζόμενες. Οι νευροτοξικότητες συνήθως εμφανίζονται μαζί ή ως απόρροια του CRS, όμως η θεραπεία tocilizumab που χρησιμοποιείται ευρέως και αντιμετωπίζει τις εκδηλώσεις CRS άμεσα, δεν παρουσιάζεται και ως η καλύτερη επιλογή για τις νευροτοξικότητες, καθώς είναι αβέβαιο ακόμα το αν έχει κάποιο θεραπευτικό αποτέλεσμα πάνω τους. Το tocilizumab καθώς αποτελεί μονοκλωνικό αντίσωμα, το μέγεθος του καθιστά σχεδόν απίθανη την διαπέραση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Η θεραπεία αυτή καθώς στοχεύει τον υποδοχέα της IL-6 και όχι την ίδια άμεσα, μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα IL-6 στον ορό του αίματος. Η IL-6 μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό με αποτέλεσμα την εκδήλωση σοβαρών νευροτοξικοτήτων. Συνοπτικά δηλαδή το tocilizumab θεωρητικά μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα IL-6 στο CSF που όπως είδαμε σχετίζεται με την εμφάνιση νευροτοξικοτήτων. Για την αντιμετώπιση των ICANS χρησιμοποιείται συνήθως η δεξαμεθαζόνη με δόση να εξαρτάται από την σοβαρότητα των συμπτωμάτων και αλλά κορτικοστεροειδή με κλιμακούμενη αύξηση της δόσης ανάλογα με το CAR T προϊόν και την σοβαρότητα των συμπτωμάτων. Η χορήγηση κορτικοστεροειδών συνιστάται σε όλους τους ασθενείς με grade 2 ICANS και πάνω. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν το Anakinra, που κανονικά χορηγείται σε ρευματοειδή αρθρίτιδα, ως ένα καλό μέσο πρόληψης εκδηλώσεων νευροτοξικοτήτων (Rubin et al., 2019; Sheth & Gauthier, 2021; Xue et al., 2021).

### **GVHD**

Η νόσος GVHD (Graft-vs-host Disease) έχει αποτελέσει μια σημαντική ανησυχία σε διάφορες μορφές κυτταρικής θεραπείας, όπως στην αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HCT) αποτελώντας μια από τις πιο συχνές επιπλοκές. GVHD προκύπτει όταν ανοσοκύτταρα (naïve T cells) από το μόσχευμα του δότη αντιδρούν και επιτίθενται στον φυσιολογικό ιστό του ατόμου που έλαβε το μόσχευμα, λόγω μη ιστοσυμβατότητας. Λόγω της ιδιαίτερα υψηλής πολυμορφικότητας των HLA γονιδίων που παρατηρείται στον άνθρωπο οι αλλογενείς εγχύσεις λεμφοκυττάρων δότη είναι δύσκολο να επιτευχθούν χωρίς να λαμβάνεται υπόψη το ρίσκο της GVHD μέσα από μη ιστοσυμβατότητα. Ο διαχωρισμός της νόσου σε οξεία (aGVHD) και χρόνια (cGVHD) γίνεται συνήθως με βάση το χρονικό όριο των 100 ημέρων και ταξινόμηση σε grades 1 ως 4 με βάση την αυξανόμενη σοβαρότητα των συμπτωμάτων (Gratwohl et al., 1995; Sanber et al., 2021).



## Προέλευση των CAR T cells και GVHD

Η προέλευση των T λεμφοκυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή των CAR T cells, διαδραματίζει κύριο ρόλο στην αποτελεσματικότητα του τελικού προϊόντος και την ασφάλεια του ως προς τον ασθενή. Το ρίσκο της επιπλοκής GVHD λαμβάνεται σοβαρά υπ' όψιν και εξαρτάται από την πηγή προέλευσης των CAR T cells που θα χορηγηθούν. Με την χρήση αυτόλογων T λεμφοκυττάρων αποφεύγουμε την εκδήλωση της νόσου μοσχεύματος έναντι στον ξενιστή. Μέχρι τώρα όλες οι εγκεκριμένες CAR T θεραπείες κάνουν αυστηρή χρήση αυτόλογων T λεμφοκυττάρων για την έκφραση των συνθετικών υποδοχέων. Έτσι δεν υπάρχει ανησυχία για αυτό το θέμα της GVHD, καθώς η ex vivo μεταφορά και έκφραση του CAR διαγονιδίου συμβαίνει σε αυτόλογα T λεμφοκύτταρα τα οποία χορηγούνται στον ασθενή, μην έχοντας δηλαδή κάποιο πρόβλημα όσον αφορά την ιστοσυμβατότητα. Θα μπορούσαμε να πούμε δηλαδή με λίγα λόγια ότι είναι από τον ασθενή για τον ασθενή. Όμως σε αρκετές περιπτώσεις, ο αριθμός των κατάλληλων αυτόλογων κυττάρων για την CAR τροποποίηση τους είναι περιορισμένος. Όχι μόνο ο αριθμός και η ποσότητα των κυττάρων μπορεί να είναι περιορισμένος, αλλά περιορισμένος μπορεί να είναι και ο χρόνος. Η παραγωγή των CAR T cells είναι μια δαπανηρή και χρονοβόρα διαδικασία, ενώ μερικοί ασθενείς μπορεί να μην έχουν την πολυτέλεια χρόνου σε περιπτώσεις ταχείας εξέλιξης του όγκου. Έτσι γεννάται η ανάγκη δημιουργίας αλλογενών “off-the-shelf” CAR T cells με ικανή αντικαρκινική δράση, αλλά παράλληλα ασφαλή για τον παραλήπτη (Depil et al., 2020; Ichiki et al., 2006; Sanber et al., 2021).

## GVHD από αλλογενή και ψευδό-αλλογενή CAR T cells

Η χρήση αυτόλογων CAR T cells σε αιματολογικές κακοήθειες έχει αποδείξει την δραστική αντικαρκινική ισχύ της. Όμως η παραγωγή αυτόλογων CAR T cells μπορεί να είναι αρκετά δύσκολη σε βρέφη και άτομα με προηγούμενη βαριά αγωγή. Οι μεγάλοι αριθμοί των διαθέσιμων T λεμφοκυττάρων αλλογενούς προέλευσης με την κατάλληλη υλικοτεχνική υποστήριξη μπορούν να παρέχουν μεγάλες ποσότητες παραγωγής CAR T cells έτοιμα για χρήση στον ασθενή όποτε τα χρειάζεται χωρίς καθυστερήσεις. Όμως, με την χρήση αλλογενών κυττάρων για την παραγωγή των CAR T cells προκύπτουν δυο γενικά προβλήματα. 1) Τα CAR T cells μέσα από τους εγγενείς TCRs να αναγνωρίσουν ως ξένα και να επιτεθούν στα κύτταρα του φυσιολογικού ιστού του ασθενή, προκαλώντας GVHD και 2) Απόρριψη των αλλογενών CAR T cells από το ανοσοποιητικό του παραλήπτη. Παρατηρείται δηλαδή η εξάρτηση της εκδήλωσης GVHD ή απόρριψης των CAR T cells εάν δεν είναι ιστοσυμβατά με τον απλότυπο του παραλήπτη, κάτι που δεν ίσχυε στην χρήση αυτόλογων T λεμφοκυττάρων για την παραγωγή των CARs (Sanber et al., 2021). Σε 20 άτομα που έλαβαν αλλογενή (από δότη) anti-CD19 CAR T cells, μόνο σε 2 παρουσιάστηκε GVHD με τον έναν ασθενή να εμφανίζει αργής εξέλιξης cGVHD με ήδη προυπάρχουσα νόσο GVHD. Ο άλλος ασθενής παρουσίασε ήπια GVHD ένα έτος μετά την έγχυση των CAR T cells. Μια άλλη μικρή ομάδα 10 ατόμων έλαβε CAR T θεραπεία για υποτροπιάζουσες αιματολογικές κακοήθειες μετά από allo-HSCT, με αλλογενή anti-CD19 CAR T cells προερχόμενα από δότη. Όλοι οι ασθενείς είχαν τουλάχιστον μια προηγούμενη χορήγηση λεμφοκυττάρων από δότη (DLI) με είτε καθόλου εκδήλωση GVHD, grade 1 aGVHD ή ήπιο cGVHD. Δεν παρουσιάστηκε GVHD σε κανέναν από τους ασθενείς μετά την έγχυση των CAR T cells και μόνο 3/10 ασθενείς παρουσίασε απόκριση στην

θεραπεία. Σε αυτό το παράδειγμα είναι δύσκολο να βγάλει κανείς συμπεράσματα ως προς την αποτελεσματικότητα γιατί κανείς από τους ασθενείς δεν δέχθηκε προθεραπεία με χημικοθεραπευτικό σχήμα καταστροφής των λεμφοκυττάρων, όπως στο πρωτόκολλο των αυτόλογων CAR T cells, κάτι που γνωρίζουμε ότι μπορεί να επηρεάσει αρκετά την αποτελεσματικότητα. Γενικά έχει παρατηρηθεί ότι η allo anti-CD19 CAR T θεραπεία μπορεί να εξαλείψει επιτυχώς κακοήθειες B κυττάρων σε άτομα με υποτροπιάζουσα B-ALL μετά από allo-HSCT χωρίς ιδιαίτερες εμφανίσεις aGVHD (Kochenderfer et al., 2013). Σε 15 άτομα με B-ALL χορηγήθηκαν humanized allo anti-CD19 CAR T cells μετά από allo-HSCT και η απόκριση στην θεραπεία ήταν καλή. Σε 10 άτομα παρουσιάστηκε aGVHD. Από αυτούς 6 άτομα εκδήλωσαν grade 1-2 aGVHD ενώ οι άλλοι 4 grade 3-4. Κατά την διάρκεια της aGVHD παρατηρήθηκε peak στα επίπεδα IL-6 και IFN $\gamma$ . Βέβαια σε 10 άτομα παρουσιάστηκε grade 1-2 CRS και σε άλλα 5 grade 3-4 CRS που σχετίζονται και με τις τιμές των παραπάνω κυτοκινών. Δυο άτομα πέθαναν από μόλυνση ενώ ένα άλλο άτομο από καρδιακή ανακοπή (P. Liu et al., 2020).

Μια μεγάλη μερίδα ασθενών δέχεται CAR T θεραπεία μετά από αποτυχημένους κύκλους χημειοθεραπείας ή για υποτροπή μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (allo-HSCT). Αφού αυτό συμβαίνει πριν την συλλογή των T λεμφοκυττάρων και δεν υπάρχει ήδη GVHD κατά την συλλογή με την διαδικασία της λευκαφαίρεσης, τα CAR T cells εν τέλει θα προέρχονται από το αλλομόσχευμα, δημιουργώντας έτσι έναν ψευδο-αλλογενή τύπο CAR T cells. CAR T cells δηλαδή που θα προέρχονται από το περιφερικό αίμα του ασθενή ενώ έχει λάβει allo-HSCT. Έτσι θεωρητικά γεννάται ο κίνδυνος αλλοδραστικότητας των κυττάρων αυτών και το ρίσκο GVHD επιπλοκής. Παρ' όλα αυτά, δεν έχει παρατηρηθεί ιδιαίτερη GVHD σε αυτήν την περίπτωση, ίσως γιατί έχει υπάρξει ανεκτικότητα μεταξύ μοσχεύματος HSCT-ασθενούς πριν την λευκαφαίρεση από το περιφερικό αίμα. Έτσι θεωρείται ότι και τα T λεμφοκύτταρα που συλλέγονται θα είναι ανεκτικά στον παραλήπτη χωρίς εκδήλωση GVHD μετά την έγχυσή τους ως CAR T cells (M. Smith, Zakrzewski, James, & Sadelain, 2018).

### **Γονιδιακή επεξεργασία και πρόληψη**

Καθώς η GVHD φαίνεται να προωθείται μέσα από την αναγνώριση του pHLA του παραλήπτη από τις TCR $\alpha\beta$  αλυσίδες naive T λεμφοκυττάρων του δότη, υπάρχουν αρκετές προσπάθειες τροποποίησης ή και αφαίρεσης του TCR για την ασφαλή και αποτελεσματική χρήση αλλογενών κυττάρων. Η ιδέα είναι ότι μέσα από την μείωση ή και αφαίρεση της έκφρασης και λειτουργίας του φυσιολογικού TCR, θα περιοριστεί η εμφάνιση GVHD (Aftab et al., 2020). Για παράδειγμα με τροποποιημένη truncated CD3 $\zeta$ , που λειτούργησε ως ανασταλτικό μόριο στον TCR, μειώθηκε η παραγωγή IFN $\gamma$  και δεν παρουσιάστηκε xeno-GVHD σε μοντέλα ποντίκων, ενώ στην συνέκφραση με NKG2D CARs περιορίστηκε η GVHD ενώ διατηρήθηκε η αντικαρκινική ισχύς των τροποποιημένων κυττάρων (Gilham et al., 2018). Σε άλλη έρευνα, με RNAi-αποσιώπηση του εγγενούς TCR σε in vivo μοντέλα, ελαχιστοποιήθηκε η έκφραση μεικτών διμερών του TCR σε T λεμφοκύτταρα με γενετικά τροποποιημένο TCR, περιορίζοντας σημαντικά τον κίνδυνο αυτοανοσίας άρα και εκδήλωσης GVHD (Bunse et al., 2014). Καθώς το knockdown του TCR επιτρέπει την ύπαρξη μιας μικρής αλλά λειτουργικής ποσότητας TCR, άλλες τεχνικές γονιδιακής επεξεργασίας

χρησιμοποιήθηκαν για την πλήρη αφαίρεση του TCR με βάση το κόψιμο του DNA, δημιουργία double strand breaks, non-homologous end joining κατά την επιδιόρθωση και δημιουργία indels με αποτέλεσμα την τροποποίηση του γενετικού τόπου (T. Guo et al., 2018). Gene editing με νουκλεάσες φαίνεται να παρέχει αρκετά καλά αποτελέσματα σε αλλογενή CAR T cells για αιματολογικές κακοήθειες. Σε αλλογενή universal anti-CD19 CAR T cells (UCART19) για αιματολογικές κακοήθειες B κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν νουκλεάσες TALENs για την διακοπή του CD52 γονιδίου και του TRAC για την αφαίρεση του TCR. Το CD52 είναι ο στόχος της alemtuzumab θεραπείας αντισωμάτων που χρησιμοποίησαν ως παράγοντα καταστροφής λεμφοκυττάρων σε συνδυασμό με την έγχυσή των CAR T cells, αποσκοπώντας έτσι στην επιβίωση τους στο περιβάλλον αυτό. Η ηλεκτροδιάτρηση του TALEN mRNA έγινε σε ιικά διαμολυσμένα T λεμφοκύτταρα και η κυτταρομετρία ροής έδειξε έκφραση του CAR κατά 85%, ενώ το 64% των κυττάρων παρουσίασε αφαίρεση του CD52 και TCR $\alpha\beta$ . Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αφαίρεση των υπολοίπων TCRs για την αποφυγή GVHD και έγχυση των CAR T cells σε 2 βρέφη με υποτροπιάζουσα B-ALL μετά από allo-HSCT. Τα βρέφη παρουσίασαν ύφεση μετά από 28 ημέρες, με μόνο ένα από αυτά να εκδηλώνει GVHD grade 2 στο δέρμα, που αντιμετωπίστηκε με τοπικά στεροειδή (Qasim et al., 2017). Genome-edited αλλογενή CAR T cells χορηγήθηκαν σε 21 ασθενείς με R/R B-ALL. 19 εξ' αυτών παρουσίασαν CRS με τους περισσότερους να εμφανίζουν grade 2 CRS, ενώ grade 3 εκδηλώθηκε σε 3 ασθενείς. 8 άτομα παρουσίασαν grade 1-2 νευροτοξικότητες, ουδετεροπενία σε 6 ασθενείς και grade 1 aGVHD σε 2 ασθενείς. Υπήρξαν 2 θάνατοι ασθενών με σήψη, CRS και κυτταροπενία (Benjamin et al., 2020). Άλλη έρευνα παρουσίασε ότι με knock in του CAR cDNA στον γενετικό τόπο του TRAC μέσω CRISPR/Cas9, βελτιώθηκε η έκφραση και η σηματοδότηση του CAR με αποτέλεσμα την ισχυρότερη αντικαρκινική δράση σε μοντέλα ποντικών, λιγότερο τονικό σήμα και εξάντληση των CAR T cells. Φαίνεται με αυτόν τον τρόπο η σημασία της γονιδιακής επεξεργασίας των CAR T κυττάρων στην ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της θεραπείας (Eyquem et al., 2017).

### **Virus-specific T cells (VSTs)**

Μεγάλο ενδιαφέρον προσελκύει και η χρήση VSTs στον χώρο των αλλογενών CAR T cells. Τα VSTs έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς μετά από allo-HSCT για την αντιμετώπιση ιικών λοιμώξεων που μπορεί να προκύψουν. Τα CAR VSTs μπορεί να φανούν χρήσιμα λόγω της μακροχρόνιας επέκτασής τους μέσω ερεθισμάτων από την αλληλεπίδραση του TCR με ιικά αντιγόνα. Αυτό βέβαια δεν σχετίζεται απαραίτητα και με βελτιωμένη αποτελεσματικότητα μέσω σηματοδότησης του TCR. Τα VSTs επιλέγονται μέσα από ex vivo ανάπτυξη T λεμφοκυττάρων μέσω ιικών αντιγόνων. Βέβαια η συνύπαρξη CAR και φυσιολογικού TCR περιστοιχίζεται από πολλά ερωτηματικά όπως αυτό της μείωσης της αποτελεσματικότητας. Μέσω της ειδίκευσης του TCR τους, μπορούν να ενεργοποιηθούν παρουσία ιικού αντιγόνου και να στρέψουν την κυτταρολυτική τους δράση μέσω της ειδίκευσης του CAR σε καρκινικά κύτταρα με θετική έκφραση του στόχου. Έρευνα ανέφερε ότι η χρήση αλλογενών CAR VSTs σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες, δεν παρουσίασε GVHD, CRS ή άλλες τοξικότητες. Τα CAR VSTs αρχίσαν να αναπτύσσονται παρουσία ενός ιικού ερεθίσματος αλλά η αποτελεσματικότητά τους δεν φαίνεται να ήταν ικανοποιητική καθώς δεν περιορίστηκε ο αριθμός των B καρκινικών κυττάρων (Ahmed et al., 2017).

Σε άλλη έρευνα, χορήγηση αλλογενών CD19 CAR VSTs σε 8 άτομα, δεν παρουσίασε GVHD σε κανέναν από τους ασθενείς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό των CAR T cells σε πολύ υψηλούς ρυθμούς παρουσία ιικού παράγοντα και εξάλειψη των CD19<sup>+</sup> κυττάρων (Cruz et al., 2013). Συμπερασματικά, η ένωση των δυο αυτών κόσμων μπορεί να φέρει στην επιφάνεια πολλά θετικά αποτελέσματα μέσα από την ειδικότητα των TCRs σε αντιγόνα ικής προέλευσης και την παράλληλη αντιγονική ειδικότητα των CARs σε όγκους (Guedan & Alemany, 2018; Y. Yang et al., 2015).

### **Εναλλακτικές**

Επιπλέον η χρήση iNKT κυττάρων με ιδιότητες T και NK κυττάρου, στοχεύοντας λιπιδιακές δομές και γδΤ λεμφοκυττάρων (TCRγδ) θα μπορούσε να επιφέρει σημαντικά αποτελέσματα στην πρόληψη και περιορισμό της GVHD. Όμως, η συλλογή τους καθίσταται δύσκολη καθώς οι συχνότητες τους στο περιφερικό αίμα είναι πολύ περιορισμένες και η συνύπαρξη τους με αβT κύτταρα θα μειώσει τα επιθυμητά αποτελέσματα (Capsomidis et al., 2018; Díaz-Basabe, Strati, & Facciotti, 2020). Μια εναλλακτική πηγή ασφαλών T λεμφοκυττάρων θα μπορούσε επιπλέον να αποτελέσει ο επαναπρογραμματισμός iPSCs. Μπορεί να παρέχει ουσιαστικά μια απεριόριστη πηγή T κυττάρων για την παραγωγή των T-iPSCs τα οποία μπορούν να πολλαπλασιαστούν, να διαφοροποιηθούν και να είναι λειτουργικά όπως τα T κύτταρα (Sadeqi Nezhad, Abdollahpour-Alitappeh, Rezaei, Yazdanifar, & Seifalian, 2021). Μερικές έρευνες έχουν παρουσιάσει στοιχεία βελτιωμένης αντικαρκινικής δράσης μέσω iPSC-derived NK κυττάρων και μακροφάγων σε συνδυασμό με CAR έκφραση, κάτι που μπορεί να φανεί ιδιαίτερος χρήσιμο στην ανάπτυξη πραγματικών “off-the-shelf” θεραπειών (Y. Li, Hermanson, Moriarity, & Kaufman, 2018; L. Zhang et al., 2020). Ο επαναπρογραμματισμός και το editing των iPSCs σε συνεργασία με CAR τεχνολογία έχει παρουσιάσει θετικά και ασφαλή στοιχεία όσον αφορά την GVHD παρέχοντας επιπλέον την επιθυμητή αντικαρκινική ισχύ στον ασθενή. Ο συνδυασμός αυτών των δυο κόσμων όμως βρίσκεται ακόμα στα αρχικά του στάδια. Η καλύτερη κατανόηση αυτού του κινδύνου είναι σημαντική για την προώθηση του πεδίου και τη διασφάλιση της ασφαλούς ανάπτυξης και χρήσης αυτών των παραγόντων στην κλινική (Depil et al., 2020).

### **Τονικό σήμα και εξασθένιση των CAR T cells**

Το τονικό σήμα όπως εξετάστηκε στα εισαγωγικά στοιχεία αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό των naïve T λεμφοκυττάρων προωθώντας την ομοιόστασή τους (D. R. Myers et al., 2017). Τα πράγματα όμως αλλάζουν όταν περνάμε στον χώρο της CAR T θεραπείας και το πως το τονικό σήμα μπορεί να επηρεάσει το όλο εγχείρημα. Το τονικό σήμα στα CAR T cells είναι πιο περίπλοκο απ’ ότι στα φυσιολογικά T κύτταρα και μπορεί να είναι ανεξάρτητο ή εξαρτημένο από τον συνδέτη. Από πρώτης άποψης, το τονικό σήμα ανεξάρτητο συνδέτη μπορεί να συντελέσει ευκολά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μέσα από ερεθίσματα ενεργοποίησης να πυροδοτήσει την αύξηση των CAR T cells. Όμως όπως φαίνεται το τονικό σήμα ωθεί προς την τελική διαφοροποίηση σε δραστικούς τύπους και σχετίζεται με γρήγορη εξάντληση των CAR T cells και αυξημένο θάνατο επαγόμενο από ενεργοποίηση. Βλέπουμε δηλαδή ότι το τονικό σήμα μπορεί να λειτουργήσει ως μέσο επιτάχυνσης της λειτουργίας των CAR T cells σπρώχνοντας τα παράλληλα προς το τέλος της ζωής τους. Με τον τρόπο αυτό,

μειώνει δραστικά την επιβίωσή τους *in vivo* θέτοντας σε κίνδυνο την όλη προσέγγιση και την αποτελεσματικότητα της θεραπείας καθώς περιορίζει αισθητά τους αριθμούς και την αντικαρκινική ισχύ των CAR T cells (Calderon, Mamonkin, & Guedan, 2020). Το τονικό σήμα μπορεί να αναγνωριστεί κατά την διάρκεια του αρχικού πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων λόγω διαφορών που παρουσιάζουν στον φαινότυπο και την ανάπτυξη των CAR T cells σε σύγκριση με τα control T κύτταρα. Το παραπάνω αποτελεί απόδειξη ότι το τονικό σήμα στα CAR T cells προωθεί την κυτταρική διαίρεση και την διαφοροποίησή τους. Ένα από τα βασικά προβλήματα των scFv-based CARs είναι ο σχηματισμός συσσωματωμάτων στην κυτταρική μεμβράνη των CAR T cells λόγω έλλειψης σταθερότητας. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι περισσότεροι CARs χρησιμοποιούν scFv προσέγγιση ως εξωκυτταρικό μηχανισμό αναγνώρισης θέτει προβλήματα στις CAR θεραπείες καθώς η δημιουργία συσσωματωμάτων έχει συσχετιστεί με την αύξηση του τονικού σήματος (Calderon et al., 2020; Gil & Schrum, 2013). Ως αποτέλεσμα, η μειωμένη επιβίωση και αντικαρκινική δράση σε συνδυασμό με τον αυξημένο κυτταρικό θάνατο που προωθείται από την ενίσχυση του τονικού σήματος παρουσιάζονται ως πιθανό ρίσκο με καταστρεπτικές συνέπειες της θεραπείας. Για τον λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητος ο σωστός συνδυασμός των τμημάτων που απαρτίζουν τον CAR. Η διαρκής ενεργοποίηση των CAR T cells από το τονικό σήμα είναι φανερή σε ορισμένους συνδυασμούς τμημάτων της δομής τους (Ajina & Maher, 2018). Φαίνεται το CD28 συνδιεγερτικό μόριο να ενισχύει το τονικό σήμα κατά την χρήση του σε κάποια είδη CAR T cells, προωθώντας παράλληλα την εξάντληση τους. Αντίθετα το 4-1BB παρουσιάζει ελαττωμένη τονική σηματοδότηση και εξάντληση παρέχοντας μεγαλύτερη επιβίωση στα CAR T cells *in vivo* (Frigault et al., 2015; Long et al., 2015). Συγκεκριμένα, CAR T cells CD19-specific με 4-1BB και CD3ζ αλυσίδες, έχουν μεγαλύτερο persistence απ' ότι τα CD19.28z, παρουσία ή και απουσία συνδέτη. Βέβαια και το είδος του ιδίου του CAR έχει σημασία. Anti-GD2 14G2a-based CAR T cells παρουσίασαν σημάδια εξάντλησης κατά την *ex vivo* αύξηση τους, ενώ FMC63-based CAR T cells με στόχο το κλασσικό CD19 ήταν πιο persistent. Σε σχέση και με τα παραπάνω, πιο έντονο τονικό σήμα και εξάντληση παρουσιάστηκε σε GD2.28z CAR T cells που σχετίστηκε με την δημιουργία CAR συσσωματωμάτων. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με T cell exhaustion, όπως TBX21 και PRDM1. Αντίστοιχα GD2.BBz CAR T cells παρουσίασαν μεγαλύτερη έκφραση TFs που έχουν σχέση με την κυτταρική μνήμη, όπως KLF6, JUN και JUNB και παρουσίασαν καλύτερη επιβίωση. Το τονικό σήμα φαίνεται να επηρεάζεται από την έκφραση των CARs, καθώς μεγαλύτερη έκφραση οδηγεί σε αύξηση της έντασης του τονικού σήματος, άρα και της φωσφορυλίωσης της ενδοκυτταρικής σηματοδοτικής περιοχής, με αποτέλεσμα την αυξημένη ενεργοποίηση του κυττάρου (Frigault et al., 2015). Αυξημένα επίπεδα έκφρασης CAR υποδοχέων πιθανόν να οδηγήσουν σε mispairing των V<sub>H</sub> και V<sub>L</sub> διαφορετικών scFv-based CARs συντελώντας στο πρόβλημα των συσσωματωμάτων (Gil & Schrum, 2013). Η αύξηση του τονικού σήματος ως απόρροια της αυξημένης έκφρασης CAR λειτουργεί ανασταλτικά ειδικά όταν η πυκνότητα του TAA στην επιφάνεια των κυττάρων στόχων απαιτεί και μεγαλύτερη CAR έκφραση. Η δομή, έκφραση και φύση του CAR φαίνεται να έχει άμεσο αντίκτυπο στην τονική σηματοδότηση των CAR T cells, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μειωμένων, εξασθενημένων, αλλοιωμένων λειτουργιών όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, παραγωγή κυτοκινών και αντικαρκινική δράση *in vivo*,

μέσα από την επαγόμενη εξάντληση των CAR T cells (Long et al., 2015; Watanabe et al., 2016).

### **On-target off-tumor τοξικότητες**

Η χρήση των CAR T cells παρατηρείται ότι συνοδεύεται από αρκετές on-target off-tumor τοξικότητες. Τα CAR T cells δηλαδή βρίσκουν τον στόχο, αλλά όχι μόνο στα καρκινικά κύτταρα. Αναγνωρίζουν τα φυσιολογικά κύτταρα και του υγιούς ιστού και τους επιτίθενται με αποτέλεσμα ανεπιθύμητες παρενέργειες. Φαίνεται να υπάρχει μια πολύ λεπτή γραμμή ανάμεσα στην κυτταρική αναγνώριση, αντικαρκινική ισχύ των CAR T cells και την πυκνότητα του στόχου στην μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων. Low affinity CAR T cells αναγνωρίζουν καλύτερα κύτταρα με υψηλότερη έκφραση του μορίου στόχου όπως συμβαίνει στα περισσότερα καρκινικά κύτταρα, αλλά παρουσιάζουν μικρότερη αντικαρκινική ισχύ από τα CAR T cells με υψηλότερο affinity. Αντίθετα, high affinity CAR T cells αναγνωρίζουν το μόριο στόχο και σε μεγάλες αλλά και σε μικρές πυκνότητες όπως συμβαίνει στα φυσιολογικά κυρίως κύτταρα, σχετίζονται με ισχυρή αντικαρκινική ισχύ αλλά παρουσιάζουν on-target off-tumor τοξικότητες. Η τροποποίηση της συγγένειας μέσα από γονιδιακές ή δομικές προσεγγίσεις έχει δείξει ότι μπορεί να μειώσει το ρίσκο τέτοιων τοξικοτήτων αλλά ακόμα παραμένει δύσκολος ο ακριβής προσδιορισμός της καθώς το βέλτιστο εύρος συγγένειας φαίνεται να διαφέρει πάρα πολύ όταν στοχεύουμε διαφορετικούς επίτοπους (Caruso et al., 2019; Castellarin et al., 2020; Drent et al., 2017).

### **Απλασία Β λεμφοκυττάρων**

Η αποτελεσματικότητα της CAR19 θεραπείας εναντίον αιματολογικών κακοηθειών έχει αποδειχθεί ξανά και ξανά μέσα από τόσες κλινικές μελέτες και φυσικά εγκεκριμένες θεραπείες με ολική ύφεση να φτάνει το 70-90% σε πολλές περιπτώσεις και μακροχρόνια θετικά αποτελέσματα να καταγράφονται μετά την έγχυση με άτομα να είναι χωρίς ασθένεια για αρκετά χρόνια μετά την θεραπεία (Globerson Levin et al., 2021). Το CD19 όπως είδαμε εκφράζεται καθ' όλη την διάρκεια της ανάπτυξης των Β διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση τους μέχρι το στάδιο των πλασματοκυττάρων, αποτελώντας με αυτόν τον τρόπο χαρακτηριστικό δείκτη της Β-γενιάς λεμφοκυττάρων. Το CD19 βέβαια εκφράζεται και σε καρκινικά Β αλλά και σε φυσιολογικά Β λεμφοκύτταρα, με αποτέλεσμα τα CD19-redirected CAR T cells να έχουν την δυνατότητα να αναγνωρίσουν και να καταστρέψουν τα CD19<sup>+</sup> κύτταρα που συναντούν, συμπεριλαμβανομένων και των υγιών CD19<sup>+</sup>. Η έντονη παραμονή των anti-CD19 CAR T cells παρέχει ισχυρή αντικαρκινική δράση καθώς στοχεύει τις κακοήθεις CD19<sup>+</sup> βλάστες σε B-ALL, αλλά αυξάνει τον κίνδυνο της καταστροφής των φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων μέσω CD19 αναγνώρισης (Davila, Kloss, Gunset, & Sadelain, 2013). Αυξημένη και παρατεταμένη δράση εναντίον των CD19<sup>+</sup> φυσιολογικών κυττάρων του αίματος μπορεί να οδηγήσει σε Απλασία Β λεμφοκυττάρων. Αποτελεί δηλαδή μια on-target off-tumor τοξικότητα CAR T θεραπείας για αιματολογικές κακοήθειες Β κυττάρων, όταν CAR T cells με στόχο το CD19 μόριο στο πλαίσιο της κυτταρόλυσης του όγκου αναγνωρίζουν τα φυσιολογικά CD19<sup>+</sup> Β λεμφοκύτταρα και τους επιτίθενται. Μια από τις πρώιμες κλινικές μελέτες με anti-CD19 CAR T cells για B-ALL, ανέφερε χαμηλότερο αριθμό Β κυττάρων στο περιφερικό αίμα ποντίκων που δέχθηκαν τα CAR T cells, συγκριτικά με την αιματολογική ανάλυση των control. Μέσα σε μια εβδομάδα από την χορήγηση

κυκλοφωσφαμίδης και των CAR T cells, παρατηρήθηκε αυτή η μείωση στον αριθμό των B, που διήρκησε μέχρι και 2 μήνες, κάτι που έδειξε και την μακροχρόνια δράση των τροποποιημένων T μέχρι εκείνη την στιγμή. Για την αποσαφήνιση των αποτελεσμάτων και την απόδειξη απλασίας B κυττάρων, ανέλυσαν τον μυελό των οστών και τον σπλήνα ενός ποντικού, που παρουσίασε την μείωση των B κυττάρων, 8 μήνες μετά την έγχυση της θεραπείας, όπου και παρατηρήθηκε δραματική μείωση B λεμφοκυττάρων επιβεβαιώνοντας την υποψία για B απλασία που προκύπτει ως αποτέλεσμα της χορήγησης των anti-CD19 CAR T cells. Η απλασία των B λεμφοκυττάρων θεωρείται πια ως ένας δείκτης της αποτελεσματικότητας και μακροχρόνιας persistence των CD19-redirected CAR T cells μετά την εμφάνιση των επιθυμητών κλινικών αποτελεσμάτων. Μελέτες έχουν αναδείξει ότι ασθενείς με απλασία B κυττάρων μικρής διάρκειας, εμφανίζουν υποτροπή της ασθένειας συχνότερα, Αρά, κατά κάποιον τρόπο, η απλασία B κυττάρων αποτελεί μια τοξικότητα των CAR T cells που ναι μεν είναι ανεπιθύμητη παρενέργεια αλλά δείχνει αποτελεσματική και μακροχρόνια θεραπεία (Davila et al., 2013; Safarzadeh Kozani, Safarzadeh Kozani, & Rahbarizadeh, 2021). Η απλασία B κυττάρων χαρακτηρίζεται από πολύ χαμηλό αριθμό B λεμφοκυττάρων και μέσα από έρευνες έχει δειχθεί ότι τα CAR T cells μπορούν να παραμείνουν για χρόνια μετά την έγχυσή τους στον ασθενή κάτι που οδηγεί σε πολύ χαμηλά επίπεδα IgG, την υπογαμμασφαιριναιμία. Πολύ χαμηλά επίπεδα IgG έχουν παρατηρηθεί από τις πρώτες 9 εβδομάδες και μπορούν να παραμείνουν χαμηλά ακόμη και 4 χρόνια μετά την έγχυση του CAR προϊόντος. Β απλασία και υπογαμμασφαιριναιμία θέτουν τον ασθενή σε κίνδυνο καθώς είναι ευάλωτος σε λοιμώξεις. Η υπογαμμασφαιριναιμία μπορεί να αντιμετωπιστεί με ανασύσταση των IgG επιπέδων με ενδοφλέβια ή υποδόρια χορήγηση IgG από το πλάσμα υγιών ατόμων. Η ακριβής απαιτούμενη ποσότητα χορήγησης δεν είναι ακόμα σαφής για την ανασύσταση της IgG του ασθενούς μετά από CAR T θεραπεία. Δόση 400mg/dl θεωρείται το minimum level χορήγησης αν και σε ασθενείς με συχνές και επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις ακόμη και μετά από IgG χορήγηση απαιτούνται μεγαλύτερες ποσότητες (Wat & Barnettler, 2022)

### **Υποτροπές**

Η στόχευση του CD19 μορίου έφερε στο προσκήνιο όλα τα ευεργετικά αποτελέσματα της CAR T θεραπείας σε ανθεκτικές ή υποτροπιάζουσες αιματολογικές κακοήθειες B κυττάρων, με αρκετά μεγάλη μερίδα ασθενών να παρουσιάζουν υψηλά CR ποσοστά και ορισμένοι να είναι cancer free για πάνω από 5 χρόνια. Παρ' όλα αυτά, η προσεκτική παρακολούθηση των ασθενών που δέχθηκαν CAR T θεραπεία, έχει δείξει υψηλό ποσοστό υποτροπής (30-60%) λόγω μειωμένης δράσης των CAR T cells ή μέσω ενός μηχανισμού επίκτητης ανθεκτικότητας του όγκου (X. Xu et al., 2019). Είδαμε πως η δομή του CAR και η προέλευση του scFv μπορούν να επηρεάσουν την τελική μορφή των CAR T cells και να τα οδηγήσουν σε εξάντληση (exhaustion), με 4-1BB συνδιεγερτικά μόρια να παρέχουν μακροχρόνια αποτελέσματα με μεγαλύτερο persistence σε σχέση με το CD28 (Guedan et al., 2018). ScFvs προέλευσης από ποντίκια σχετίζονται με πρόωρο exhaustion λόγω υψηλής ανοσογονικότητας (Cao et al., 2018). Αναφορές για χαμηλό persistence ακόμα και με υποτροπή της B-ALL έχουν γίνει με την χρήση αυτών των scFvs καθώς η σύνδεση τους με τον επίτοπο του CD19 μπορεί να πυροδοτήσει HLA-restricted ανοσοαπόκριση και γρήγορη εξάντληση. Μια μακροχρόνια παρακολούθηση ατόμων που δέχθηκαν anti-CD19 CAR T cells έδειξε ότι

τα παιδιά και νεαροί ενήλικες είχαν μεγαλύτερους event-free χρόνους επιβίωσης. Επιπλέον τα CAR T cells από νεαρούς δότες παρουσίασαν καλύτερη λειτουργικότητα σε σχέση με αυτά που προέρχονταν από γηραιότερους πληθυσμούς, κάτι που δείχνει σημαντική επίδραση στην αποτελεσματικότητα *in vivo*. Όλα τα παραπάνω σχετίζονται με την μακροχρόνια ενεργοποίηση των CAR T cells και αποτελεσματικότητα *in vivo* και μπορούν να επιδράσουν αρνητικά, με αποτέλεσμα την υποτροπή της ασθένειας όταν οι παράμετροι της θεραπείας δεν είναι ικανοποιητικοί (X. Xu et al., 2019).

Γενικά, μέσα από τις μελέτες και την παρακολούθηση των ασθενών μετά την CD19 CAR T θεραπεία, παρατηρήθηκαν δυο καθαρά μοτίβα υποτροπής που μπορεί να ακολουθήσει την έγχυση των CAR T cells:

- CD19<sup>+</sup> υποτροπή, που σχετίζεται με την αποτελεσματικότητα του προϊόντος, και
- CD19<sup>-</sup> υποτροπή, που δεν έχει άμεση σχέση με τις ιδιότητες και την αποτελεσματικότητα των CAR T cells, αλλά με ένα σύνολο μηχανισμών που οδηγούν στην μείωση ή και έλλειψη του CD19 στόχου στην μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων (Dourthe et al., 2021; Qiu et al., 2022).

### **CD19 αρνητική υποτροπή**

Ανάμεσα στους ασθενείς που παρουσίασαν υποτροπή μετά την CAR19 θεραπεία για αιματολογικές κακοήθειες B κυττάρων, το 10-20% παρουσίασε CD19 αρνητική υποτροπή της ασθένειας, CD19<sup>-</sup> relapse. Φαίνεται ότι οι μηχανισμοί που επάγουν την CD19 αρνητική υποτροπή βασίζονται σε μια προσπάθεια προσαρμογής των καρκινικών TAA<sup>+</sup> κυττάρων στην ανοσολογική πίεση των CAR T cells. Η ρύθμιση της έκφρασης του αντιγόνου στόχου από τους ίδιους του όγκους αποτελεί ένα μεγάλο πρόβλημα καθώς η μειορύθμιση ή έλλειψη του στόχου θα οδηγήσει σε antigen escape παρά το *in vivo* persistence των CAR T cells, με πιθανότητα εμφάνισης υποτροπής (Majzner & Mackall, 2018; X. Xu et al., 2019). Σε ανάλυση 12 ασθενών με CD19 αρνητική υποτροπή μετά από CAR19 θεραπεία, παρουσιάστηκαν frameshift μεταλλάξεις στα CD19 εξόνια 2-5 και πολλοί παρουσίασαν απώλεια ετεροζυγωτίας κατά την CD19<sup>-</sup> υποτροπή. Οι μεταλλάξεις παρουσιάζονταν στην πλειοψηφία των ανθεκτικών καρκινικών κυττάρων με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφορών ισομορφών και απώλεια CD19 στόχου. Άλλα μόρια της B γενιάς λεμφοκυττάρων, όπως το CD20, παρατηρήθηκαν στην κυτταρική επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων στους όγκους, παρά την απώλεια του CD19, κάτι που ίσως υποδεικνύει σημάδι προσαρμογής του όγκου στην CD19-targeting θεραπεία ενώ διατηρήθηκε σταθερή η έκφραση των άλλων μορίων (Orlando et al., 2018). Σε άλλη έρευνα, RNA sequencing έδειξε εναλλακτικό μάτισμα της CD19 με απώλεια εξονίου 2 ή/και 5-6 εξονίου σε DLBCL κατά την υποτροπή. Η απώλεια του CD19 σχετίστηκε με το εναλλακτικό μάτισμα του CD19 mRNA και επιλογή ισομορφών με έλλειψη του στόχου. Όπως και με τα παραπάνω, άλλη μελέτη έδειξε διαγραφή του CD19 γονιδίου ή frameshift mutations στο εξόνιο 2 της CD19 από δείγματα κυττάρων ασθενών με B-ALL υποτροπή μετά από CD19-specific CAR T cell θεραπεία. Επιπλέον παρουσιάστηκε μείωση της έκφρασης του SRSF3 (splicing factor) που είναι υπεύθυνος για την διατήρηση του εξονίου 2 κατά το μάτισμα. Αυτό οδήγησε στην επιλογή CD19 ισομορφών χωρίς το εξόνιο 2 ή αλλοιωμένη διαμεμβρανική και κυτταροπλασματική περιοχή (με N-truncated



domains). Το γεγονός αυτό είχε ως αποτέλεσμα την έλλειψη του επιτόπου που αναγνωρίζεται από το FMC63 scFv των anti-CD19 CAR T cells κάνοντας τα καρκινικά κύτταρα αόρατα στην ανοσοθεραπεία (Sotillo et al., 2015).

### **Lineage switch**

Ένας ιδιαίτερος antigen loss μηχανισμός αντιγονικής διαφυγής στις λευχαιμίες αποτελεί το lineage switch και παρουσιάζεται κυρίως σε ασθενείς με MLL-r λευχαιμίες, όπως βρέφη με B-ALL. Οι MLL-r (Mixed-lineage leukemia rearrangement) λευχαιμίες αποτελούν απόρροια χρωμοσωμικής μετατόπισης και σύντηξης γονιδίων σε έναν υπότυπο οξείας λευχαιμίας, που αντιπροσωπεύει περίπου το 10% των περιστατικών οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας και το 2.7% οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και χαρακτηρίζονται από ξαφνική και ραγδαία εξέλιξη, επιθετικότητα και ιδιαίτερα κακή πρόγνωση. Το lineage switch ουσιαστικά αποτελεί αλλαγή στο φαινότυπο της οξείας λευχαιμίας με βάση την μυελική της προέλευση ως αποτέλεσμα της στόχευσης του CD19 από την ανοσοθεραπεία. Τα καρκινικά λευχαιμικά κύτταρα δηλαδή, όχι μόνο σταματούν να εκφράζουν το CD19 αλλά αποκτούν και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά AML. Σε κλινική μελέτη, anti-CD19 CAR T cells χορηγήθηκαν σε 7 ασθενείς με MLL B-ALL, με τους ασθενείς να πετυχαίνουν CR:100%. Έναν μήνα όμως μετά την έγχυση 2 ασθενείς παρουσίασαν CD19<sup>-</sup> AML υποτροπή, αναδεικνύοντας την προσοχή που απαιτείται ο χειρισμός ασθενών με R/R MLL B-ALL κατά την CD19-redirected ανοσοθεραπεία (El Chaer, Keng, & Ballen, 2020; Gardner et al., 2016; L. Z. Li et al., 2020).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**

### **ΣΤΕΡΕΟΙ ΟΓΚΟΙ**

Η CAR T cell θεραπεία έχει παρουσιάσει αξιοσημείωτη επιτυχία στην αντιμετώπιση αιματολογικών κακοηθειών B κυττάρων. Οι πρώτες εγκεκριμένες θεραπείες για λευχαιμίες και λεμφώματα άνοιξαν τον δρόμο για την χρήση της συγκεκριμένης μεθοδολογίας και σε άλλα είδη καρκίνου (Globerson Levin et al., 2021). Η μεταφορά της CAR T θεραπείας στον τομέα των στερεών όγκων αποτελεί μια ιδιαίτερη, σύγχρονη πρόκληση της ACT θεραπείας, με πολλές προσπάθειες να παρατηρούνται σε διάφορα είδη όγκων με πολλές δυσκολίες και ποικίλα αποτελέσματα. Η πρόκληση αυτή προκύπτει από την ίδια την φύση των στερεών όγκων, την ιδιαιτερότητα του καθενός είδους και της μεγάλης ετερογένειας που παρατηρείται ανάμεσά τους. Οι φυσικές δομές και οι ιδιότητες των στερεών όγκων δεν συναντώνται και στις αιματολογικές κακοήθειες όπου έχει η CAR T cell θεραπεία φέρει σημαντικά αποτελέσματα. Στους στερεούς όγκους, τα CAR T cells θα πρέπει να έρθουν αντιμέτωπα με μια σειρά προκλήσεων που θα τους τεθούν από τον όγκο καθώς και από το περιβάλλον του. Ένα περιβάλλον ιδιαίτερα δυσπρόσιτο και αφιλόξενο, προσαρμοσμένο πια στα μέτρα του όγκου. Φαίνεται η αιτία της μειωμένης αποτελεσματικότητας των CAR T cells σε στερεούς όγκους όπως εγκεφάλου, να είναι πολυπαραγοντική, συμπεριλαμβανομένου και του περιορισμένου πολλαπλασιασμού και ανάπτυξης στο σημείο του όγκου (Marofi et al., 2021).

Παρά τις δυσκολίες και τα εμπόδια της CAR T cell θεραπείας στον κλάδο των στερεών όγκων, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι υπάρχει μια γενική σειρά παραμέτρων που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ένα καλό κλινικό αποτέλεσμα

- ✓ Επιλογή του κατάλληλου επίτοπου
- ✓ Δομή CAR
- ✓ CAR T cell δόσεις και τρόπος χορήγησης
- ✓ “homing” γενικός όρος για την είσοδο των CAR T cells στο περιβάλλον του όγκου
- ✓ Χημειοθεραπεία για καταστροφή λεμφοκυττάρων και την επακόλουθη υποστήριξη του ασθενούς (D'Aloia, Zizzari, Sacchetti, Pierelli, & Alimandi, 2018).

### **Αντιγόνα Στόχοι Στερεών Όγκων**

Ένας από τους πιο σημαντικούς και παράλληλα δύσκολους παράγοντες για την επιτυχημένη προσαρμογή της CAR T θεραπείας στους στερεούς όγκους αποτελεί η επιλογή του κατάλληλου μορίου στόχου. Μια από τις πρωταρχικές διαφορές ανάμεσα στους στερεούς όγκους και τις αιματολογικές κακοήθειες είναι εύρεση κατάλληλου αντιγόνου. Η πυκνότητα του αντιγόνου στόχου στην κυτταρική μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων επηρεάζει σημαντικά την σηματοδότηση, ενεργοποίηση, δράση και παραγωγή κυτοκινών από τα CAR T cells (Majzner et al., 2020). Βέβαια, κριτήριο και στην επιλογή αντιγόνου αποτελεί και η πυκνότητα του στόχου όταν εκφράζεται και στα φυσιολογικά κύτταρα. Η στόχευση ενός τέτοιου μορίου θέτει σε κίνδυνο τον ασθενή αυξάνοντας το ρίσκο για on-target off-tumor τοξικότητες. Ειδικά, στην περίπτωση των στερεών όγκων δεν μπορείς να ρισκάρεις, μέσα από τοξικότητες, να θυσιάσεις υγιή ιστό. Στις αιματολογικές κακοήθειες, οι on-target off-tumor τοξικότητες από την παραμονή των CAR T cells, όπως η απλασία B λεμφοκυττάρων και η υπογαμμασφαιριναιμία που μπορεί να προκύψουν από την παρατεταμένη καταστροφή φυσιολογικών κυττάρων με θετική έκφραση του στόχου, μπορούν να αντιμετωπιστούν με ενδοφλέβιες συμπληρωματικές χορηγήσεις. Σε ιστούς με πολύ αργή ή μηδενική ανάπλαση, όπως ο νευρικός ιστός, οι on-target off-tumor τοξικότητες θα μπορούσαν να είναι καταστροφικές (Castellarin et al., 2020; Richman et al., 2018; Sun, Hao, Yang, Zhang, & Fu, 2018).

Η ομοιογένεια του στόχου που παρατηρείται στις αιματολογικές κακοήθειες δεν συναντάται και στους στερεούς όγκους. Το CD19 αποτέλεσε στόχο πολλών μελετών για B-ALL καθώς αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη των B λεμφοκυττάρων. Η ύπαρξη ενός τέτοιου στόχου που να εκφράζεται ομοιογενώς σε όλα τα κύτταρα του στερεού όγκου δεν συμβαίνει εύκολα, καθώς οι στερεοί όγκοι χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια έκφρασης (Bräunlein & Krackhardt, 2017; Martinez & Moon, 2019). Συγκεκριμένα, σε αρκετούς όγκους μόνο ένας πληθυσμός καρκινικών κυττάρων εκφράζει το μόριο στόχο. Τα tumor specific antigens είναι ιδιαίτερα περιορισμένα στον αριθμό τους και σπάνια οι στερεοί όγκοι εκφράζουν ένα τέτοιο μόριο. Η εύρεση όμως ενός TSA θα αποτελούσε ευτύχημα, καθώς θα εκφράζεται αποκλειστικά στα καρκινικά κύτταρα και τα φυσιολογικά κύτταρα δεν θα κινδυνεύαν από την κυτταρολυτική δράση των CAR T cells. Η κακή ειδικότητα και η μικρή αποτελεσματικότητα που παρουσιάζουν τα CAR T cells στα επιθηλιακά κύτταρα οφείλεται στην έλλειψη τέτοιων ειδικών αντιγόνων στόχων. Στόχοι μελετών για στερεούς όγκους αποτελούν κυρίως μόρια που εκφράζονται σε μεγάλες ποσότητες στα καρκινικά κύτταρα και

λιγότερο στα φυσιολογικά κύτταρα, τα tumor associated antigens (TAAs). Η περιορισμένη αποτελεσματικότητα των κλινικών μελετών με την στόχευση των TAAs ίσως να προέρχεται από τον ίδιο τον μηχανισμό αυτοανοχής κατά την θυμική ωρίμανση των T λεμφοκυττάρων. Η ύπαρξη των TSAs μόνο στην κυτταρική επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων συνεπάγεται και έλλειψη θυμικής αρνητικής επιλογής T λεμφοκυττάρων ως προς την ανοχή τους σε αυτοπεπτίδια καθώς το TSA είναι μοναδικό προς τον όγκο και δεν τίθεται θέμα αυτοανοχής (C. C. Smith et al., 2019).

### **Νεοαντιγόνα (Neoantigens)**

Τα νεοαντιγόνα συγκατατίθενται στην υποκατηγορία των tumor specific antigens. Προέρχονται από μεταλλάξεις στο γονιδίωμα καρκινικών κυττάρων και αποτελούν μια καλή πηγή πιθανών στόχων για ανοσοθεραπεία. Καθώς η έκφραση τους αποτελεί χαρακτηριστικό μόνο των καρκινικών κυττάρων από τα οποία προέρχονται, η στόχευσή τους μοιάζει λογική επιλογή για τα CAR T cells. Τα νεοαντιγόνα έχουν έρθει στο επίκεντρο της προσοχής ως πιθανοί βιοδείκτες καρκινικών κυττάρων είτε ως στόχοι της ACT ανοσοθεραπείας δίνοντας ελπίδα στην στόχευση καρκινικών ειδικών μορίων κυτταρικής επιφάνειας. Νεοαντιγόνα μπορεί να προέρχονται από μια ποικιλία μη συνώνυμων γενετικών αλλοιώσεων όπως single nucleotide variants (SNVs) με απλή αντικατάσταση μιας βάσης νουκλεοτιδίου και frameshift mutations μέσω indels μη πολλαπλάσιων του 3 (Turajlic et al., 2017). Το γεγονός ότι τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται συνήθως από μεγάλο αριθμό σωματικών μεταλλάξεων σε συνδυασμό με τις τεχνολογίες αλληλούχισης όπως DNA, RNA, whole exome (το σύνολο των εξονίων) sequencing, μπορούμε να παρατηρήσουμε την δημιουργία νεοαντιγόνων. Τεχνικές Next Generation Sequencing μας παρέχουν την δυνατότητα να αναγνωρίζουμε tumor-specific γενετικές αλλοιώσεις σε περιοχές κωδικοποίησης πρωτεϊνών και γρήγορη πρόβλεψη ύπαρξης νεοαντιγόνου, κάτι που λύνει πολλά προβλήματα ως προς τον στόχο στον κλάδο της ανοσοθεραπείας (Leko & Rosenberg, 2020). Χαρακτηριστικά, σε μια έρευνα με whole exome sequencing σε δείγματα μελανώματος παρατήρησαν μεταλλάξεις σε επίτοπους των καρκινικών κυττάρων καθώς και πληθώρα T λεμφοκυττάρων να αποκρίνονται στο μεγαλύτερο ποσοστό των νεοεπίτοπων (Cohen et al., 2015). Άλλη έρευνα παρατήρησε την ύπαρξη tumor infiltrating lymphocytes ειδικά για νεοεπίτοπους σε 5 ασθενείς με γλοιοβλάστωμα μέσα από DNA sequencing (Valentini et al., 2018). Whole exome sequencing σε καρκινικά κύτταρα παγκρέατος για την πρόβλεψη νεοαντιγόνων παρουσίασε θετική συσχέτιση ανάμεσα στον αριθμό νεοαντιγόνων, τον αριθμό CD8<sup>+</sup> κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων και την αυξημένη επιβίωση στον ασθενή (Balachandran et al., 2017). Παρ' όλα αυτά η επιλογή κατάλληλου στόχου είναι μόνο το αρχικό στάδιο για την βελτίωση της αποτελεσματικότητας της CAR T cell θεραπείας στους στερεούς όγκους. Το υψηλό μεταλλακτικό φορτίο των καρκινικών κυττάρων (tumor mutational burden) σε αρκετά είδη στερεών όγκων, σε συνδυασμό με τεχνικές αλληλούχισης που μας παρέχουν γρήγορες προβλέψεις για την έκφραση νεοαντιγόνων, μπορούν να παρέχουν ένα εύρος στόχων που θα εκφράζονται αποκλειστικά σε όγκους, για την επιλεκτική στόχευση των καρκινικών κυττάρων και την ελαχιστοποίηση των τοξικοτήτων (Leko & Rosenberg, 2020).

### **Φυσικά εμπόδια**

Ακόμα και μετά την επιλογή του κατάλληλου στόχου, τα φυσικά εμπόδια των στερεών όγκων εμποδίζουν την αποτελεσματική χρήση των CAR T cells. Στους υγρούς όγκους μετά την έγχυση των CAR T cells δεν παρουσιάζεται κάποιο σημαντικό εμπόδιο στην προσέγγιση του στόχου. Τα CAR T cells βρίσκουν μέσα από την κυκλοφορία του αίματος τα καρκινικά κύτταρα με το αντίστοιχο μόριο στόχο και τα καταστρέφουν λόγω κοινής αιμοποιητικής προέλευσης με τους όγκους που στοχεύουν. Τα τροποποιημένα T είναι πιο εύκολο να μεταφερθούν σε κοινές περιοχές εκτός του αίματος, στον μυελό των οστών ή στους λεμφαδένες, και να επιτεθούν στα καρκινικά κύτταρα. Στους στερεούς όγκους όμως, δεν είναι τόσο απλή η κατάσταση. Η πρώτη δυσκολία με την οποία θα έρθουν αντιμέτωπα τα CAR T cells μετά την χορήγησή τους στον ασθενή είναι τα φυσικά εμπόδια των στερεών όγκων. Τα CAR T cells μπορούν να καταστρέψουν αποτελεσματικά τα καρκινικά κύτταρα μόνο όταν εισέλθουν στην θέση του όγκου και ειδικά προς το εσωτερικό του. Για να είναι λειτουργικά δηλαδή, πρώτα πρέπει να φτάσουν, να διεισδύσουν και να παραμείνουν στο περιβάλλον του όγκου, ξεπερνώντας τα φυσικά και λειτουργικά εμπόδια στο επιθήλιο και στρώμα. Μια σειρά μορίων και χημειοτακτικών σημάτων απαιτείται για την προσέλευση και την είσοδο των CAR T cells στο σημείο του όγκου. Ο τρόπος με τον οποίο προσελκύνονται τα CAR T cells στον όγκο, η εξαγγείωση και το homing αποτελούν κάποιες από τις πρώτες δυσκολίες για την επιτυχημένη εφαρμογή της CAR T θεραπείας σε στερεούς όγκους (Bell & Gottschalk, 2021; Guerra, Di Pietro, Basile, Trerotola, & Alberti, 2021; Vignali & Kallikourdis, 2017). Οι χημειοκίνες κατέχουν πρωταρχικό ρόλο για την προσέλευση και είσοδο των CAR T cells στο περιβάλλον του όγκου. Οι seleκτινές δεσμεύουν τα T λεμφοκύτταρα από την κυκλοφορία του αίματος που μέσω χημειοτακτικών σημάτων καταφθάνουν στην περιοχή του όγκου. Η επακόλουθη σηματοδότηση εκκινεί την διαδικασία της εξαγγείωσης και της εισόδου των λεμφοκυττάρων στον όγκο. Άρα από την μεριά των CAR T cells, απαιτείται να εκφραστούν μόρια, όπως οι συνδέτες της E-σελεκτίνης και P-σελεκτίνης, για την πρόσδεση και κύλιση των λεμφοκυττάρων στο ενδοθήλιο. Η σύμπλεξη των υποδοχέων χημειοκινών όπως CXCR3, CXCL9 και CXCL10 επάγει την έκφραση των LFA-1 και VLA-4, τους συνδέτες των μορίων διακυτταρικής προσκόλλησης, ICAM-1 και VCAM-1 αντίστοιχα, επιτρέποντας την προσκόλληση των λεμφοκυττάρων στο ενδοθήλιο. Στην συνέχεια τα T λεμφοκύτταρα θα πρέπει να διαπεράσουν το ενδοθήλιο, μια διαδικασία που ονομάζεται διαπίδυση, μέσα από παρακυτταρικά διαστήματα ή διαμέσω ενός ενδοθηλιακού κυττάρου (διακυτταρικός τρόπος) και στην συνέχεια να διαπεράσουν την βασική μεμβράνη, όπου θα έρθουν αντιμέτωπα με το μικροπεριβάλλον του όγκου (D'Aloia et al., 2018). Όμως έχει φανεί ότι μερικά είδη στερεών όγκων μπορούν να παράγουν χημειοκίνες όπως CXCL12 και CXCL5 που αναστέλλουν την μετακίνηση των T λεμφοκυττάρων προς την περιοχή του όγκου ή οι υποδοχείς χημειοκινών των T λεμφοκυττάρων να μην ταιριάζουν ικανοποιητικά με τις χημειοκίνες του όγκου με αποτέλεσμα την μικρή προσέλευση T κυττάρων στο σημείο. Έτσι κρίνεται απαραίτητη η διερεύνηση του προφίλ των χημειοκινών του κάθε όγκου και η τροποποίηση των CAR T cells για να ταιριάζουν με τις απαιτήσεις του όγκου (Marcuzzi, Angioni, Molon, & Cali, 2018; Zboralski, Hoehlig, Eulberg, Frömming, & Vater, 2017). Πράγματι, τροποποιημένα T λεμφοκύτταρα με έκφραση CXCR2 παρουσίασαν μετακίνηση προς πληθώρα καρκινικών κυττάρων με έκφραση CXCL1 (Kershaw et al., 2002). Η ανεπαρκής παρουσία CD8<sup>+</sup>CXCR3<sup>high</sup> T λεμφοκυττάρων σε

αρκετούς όγκους έχει άμεση σχέση με την ετερογένεια των όγκων και την ανισορροπία έκκρισης χημειοκινών (Groom & Luster, 2011).

Ένας ακόμα παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψιν είναι η αγγείωση του όγκου και πως επηρεάζει το χημειοτακτικό προφίλ. Τα high endothelial venules (HEVs) αποτελούν εξειδικευμένα αιμοφόρα αγγεία για την μετακίνηση λεμφοκυττάρων από την κυκλοφορία του αίματος στους λεμφαδένες και τα υπόλοιπα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Η ύπαρξή τους έχει άμεση σχέση με την εισχώρηση των T λεμφοκυττάρων στον όγκο και αυξημένη πυκνότητα των HEVs σε όγκους όπως το μελάνωμα, έχουν σχετιστεί με υποχώρηση του όγκου (Ager, 2017). Μια έρευνα σε μελάνωμα έδειξε ότι αυξημένη HEV πυκνότητα σχετίστηκε με έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν χημειοκίνες όπως CCL2, CCL5, CCL19 και 21, και CXCL9-13 (Martinet et al., 2012). Άλλη μελέτη παρουσίασε την συσχέτιση του αυξημένου αριθμού T λεμφοκυττάρων σε καρκίνο παχέος εντέρου με την έκφραση CXCL9-11, συμπληρώνοντας τα παραπάνω ως προς την σχέση HEVs και των TILs (Kistner, Doll, Holtorf, Nitsche, & Janssen, 2017). Η συσχέτιση των χημειοκινών με τον αριθμό των T λεμφοκυττάρων που έχουν εισβάλλει στον όγκο έχει γεννήσει μερικές ιδέες αξιοποίησης των χημειοτακτικών σημάτων για την προσέλκυση και διείσδυση στον όγκο μέσα από προσπάθεια τροποποίησης του ίδιου του όγκου για να ταιριάζει με τους υποδοχείς χημειοκινών των CAR T cells. Μια έρευνα έκανε χρήση ενός vaccinia ιού για την παράδοση CXCL11 χημειοκίνης εντός του όγκου σε μοντέλα ποντικών με μεσοθηλίωμα. Μετά την ενδοφλέβια χορήγηση CAR T cells με στόχο την μεσοθηλίνη, παρατηρήθηκε αντικαρκινική δράση και αυξημένος αριθμός T λεμφοκυττάρων που είχαν διεισδύσει στον όγκο (Moon et al., 2018). Άλλη έρευνα παρουσίασε έλεγχο της εξέλιξης του όγκου και αυξημένη διείσδυση CAR T cells με την χορήγηση ενός ογκολυτικού αδενοϊού με έκφραση CCL5 και IL-15, κατευθείαν στα κύτταρα νευροβλαστώματος. Επιπλέον, χρήση CAR NK-92 κυττάρων με στόχο το EGFR, σε συνδυασμό με ογκολυτικό ερπητοϊό παρουσίασε καλά αποτελέσματα σε προκλινικά μοντέλα μετάστασης καρκίνου του μαστού. Η συνέκφραση CAR και υποδοχέων χημειοκινών φαίνεται να μπορεί να επιφέρει θετικά αποτελέσματα. Έκφραση mesothelin-CARs και CCR2 σε CAR T cells, φάνηκε να προσδίδει ευκολία homing και υποχώρηση του όγκου. Ένα βήμα παραπάνω έγινε με armored 4<sup>th</sup> γενιάς mesothelin-CARs με ταυτόχρονη έκφραση IL-7 και CCL19, όπου και παρουσιάστηκε ολική υποχώρηση του όγκου και αυξημένη επιβίωση σε όγκους μεσοθηλιώματος (Adachi et al., 2018).

Ένας τρόπος που διερευνάται, πολύ πιο άμεσος για την είσοδο των CAR T cells στο μικροπεριβάλλον του όγκου, παρακάμπτοντας αρκετά προβλήματα, αποτελεί η χορήγηση της θεραπείας απευθείας στο εσωτερικό του όγκου. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε σε μεταστατικό καρκίνο μαστού στον εγκέφαλο με ενδοκρανιακή χορήγηση HER2-CAR T cells με 4-1BB ή CD28 συνδιεγερτική δομή. Αυτός ο τρόπος άμεσης χορήγησης παρουσίασε πολύ καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την ενδοφλέβια έγχυση με 100% επιβίωση και ολοκληρωτική εξάλειψη του όγκου. Σημειωτέων, τα 4-1BB based CAR T cells παρουσίασαν λιγότερο exhaustion, καλύτερο πολλαπλασιασμό και πιο επιλεκτική καρκινική αναγνώριση (Priceman et al., 2018). Σε αδενοκαρκίνωμα του στομάχου (γαστρικός καρκίνος), anti-PSCA CAR T cells με χορήγηση απευθείας στην περιοχή του όγκου παρουσίασαν κυτταρολυτική δράση και παραγωγή κυτοκινών κατά την ενεργοποίησή τους από καρκινικά PSCA+

κύτταρα, ενώ η ενδοφλέβια χορήγηση δεν παρουσίασε θεραπευτική βελτίωση (Wu et al., 2020). mRNA-transfected c Met CAR T cells με χορήγηση απευθείας στον όγκο παρουσίασαν αντικαρκινική δράση και ασφάλεια χωρίς τοξικότητες πάνω από grade 1 (Tchou et al., 2017). Άλλη έρευνα έκανε τοπική χορήγηση HER2-CAR T cells 4-1BB, based σε NSG μοντέλα ποντικών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού στον εγκέφαλο, τα οποία παρουσίασαν ισχυρή αντικαρκινική δράση. Πρέπει να τονιστεί ότι αυτός ο τρόπος χορήγησης της θεραπείας ίσως σχετίζεται και με μεγαλύτερη ασφάλεια καθώς φαίνεται να περιορίζει τις on-target off-tumor σύμφωνα με τα τωρινά δεδομένα (Priceman et al., 2018).

### **Μικροπεριβάλλον όγκου – tumor microenvironment (TME)**

Το μικροπεριβάλλον του όγκου αποτελεί ένα αφιλόξενο, ιδιαίτερα εχθρικό περιβάλλον για τα CAR T cells. Ακόμα και μετά τα εμπόδια της εισβολής τους στην περιοχή του όγκου, έχουν να έρθουν αντιμέτωπα με τις ιδιότητες του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Είναι γνωστό ότι με την εμφάνιση του καρκίνου, τα καρκινικά κύτταρα πυροδοτούν μοναδικές μοριακές και κυτταρικές αλλαγές στον ιστό του ασθενούς. Το TME μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια πολυσύνθετη και συνεχώς εξελισσόμενη οντότητα. Τα κυτταρικά και ακυτταρικά συστατικά που απαρτίζουν το TME έχουν την δυνατότητα να επαναπρογραμματίσουν την έναρξη και ανάπτυξη του όγκου, την εισβολή καρκινικών κυττάρων στους γύρω ιστούς με αποτέλεσμα την μετάσταση και την απόκριση του όγκου στις θεραπείες. Τα κύτταρα που απαρτίζουν το TME είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού και κύτταρα του στρώματος, κύτταρα δηλαδή που ανήκουν στον συνδετικό ιστό όπως ινοβλάστες. Τα κύτταρα του TME έχουν άμεση σχέση, αλληλοεπιδρούν και ελέγχονται από τα άλλα μη-κυτταρικά συστατικά, την εξωκυττάρια μήτρα και τα μεγάλης σημασίας εξωσώματα (Marofi et al., 2021).

### **Κυτταρικά συστατικά μικροπεριβάλλοντος του όγκου**

#### **Ανοσοκύτταρα**

Στο μικροπεριβάλλον του όγκου μπορεί να παρατηρηθούν ποικίλοι τύποι ανοσοκυττάρων με άμεση επίδραση στον όγκο. Μπορούν να καταστέλλουν την ανάπτυξη του όγκου ή και να προωθούν την ογκογένεση διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό κομμάτι του TME (Lei et al., 2020; Rodriguez-Garcia, Palazon, Noguera-Ortega, Powell, & Guedan, 2020).

#### **T λεμφοκύτταρα**

Διαφορετικοί πληθυσμοί T λεμφοκυττάρων μπορούν να βρίσκονται στο TME. Από αυτούς, τα CD8<sup>+</sup> T κυτταροτοξικά μπορούν να αναγνωρίσουν και να καταστρέψουν τα καρκινικά κύτταρα συντελώντας στην εξάλειψη του όγκου. Ταυτόχρονα μπορούν να περιορίσουν την αγγειογένεση μέσω παραγωγής IFN $\gamma$ . Βέβαια, υπάρχουν μηχανισμοί του όγκου που μπορεί να καταστείλουν την δράση των T κυτταροτοξικών, ως μέσο προσαρμογής στην ανοσολογική πίεση που ασκείται. Η διαφοροποίηση των CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση εναντίον του TME. Μεγάλος αριθμός CD4<sup>+</sup> T helper 1 (Th-1) κυττάρων στο TME έχει συσχετιστεί με καλύτερη αποτελεσματικότητα, καθώς οι προφλεγμονώδεις ιδιότητές τους μέσα από IL-2 και IFN $\gamma$  μπορούν να συνδράμουν την δράση των

κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων (Maimela, Liu, & Zhang, 2019; Tay, Richardson, & Toh, 2021).

Άλλος τύπος που όμως δρα ανασταλτικά στην αντικαρκινική δράση των παραπάνω T κυττάρων είναι τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα. Τα  $T_{regs}$  έχοντας γενικά ρυθμιστικό ρόλο, με χαρακτηριστικό φαινότυπο  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ , περιορίζοντας την ανοσοαπόκριση, είναι σαν να κρατούν τις ισορροπίες διατηρώντας την ομοιόσταση. Στο πλαίσιο όμως του όγκου και του TME λόγω της ανοσοκατασταλτικής δράσης τους, ελαχιστοποιούν την αντικαρκινική δράση του ανοσοποιητικού, προάγοντας την ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου (Togashi, Shitara, & Nishikawa, 2019). Μπορούν να επιδράσουν θετικά στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων μέσω της έκκρισης αυξητικών παραγόντων και έμμεσα μέσα από τις αλληλεπιδράσεις τους με στρωματικά κύτταρα του όγκου. Τα  $T_{regs}$  καταστέλλουν την κυτταροτοξική δράση των  $CD8^+$  T κυττάρων μέσω ανταγωνιστικού χαρακτήρα για την IL-2, παραγωγή ανοσοκατασταλτικών κυτοκινών IL-10 και TGF $\beta$  (Z. Li, Li, Tsun, & Li, 2015). Μπορούν επίσης να επηρεάσουν μέσα από την καταστολή αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και ενεργοποίησης της δράσης των  $CD8^+$  μέσω CTLA-4 και με granzyme ή perforin λύση των δραστικών κυττάρων (Togashi et al., 2019). Σε ασθενείς με καρκίνο, τα ρυθμιστικά T βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στο περιφερικό αίμα του ατόμου. Σε ανοσοθεραπεία με TILs, οι ασθενείς που είχαν καλύτερη απόκριση στην θεραπεία παρουσίασαν και μειωμένο αριθμό  $T_{regs}$  στο περιφερικό τους αίμα. Μια από τις εξηγήσεις που έχει δοθεί για τα περιορισμένα και μη ενθαρρυντικά αποτελέσματα πολλών κλινικών μελετών χωρίς προθεραπεία για την καταστροφή των λεμφοκυττάρων πριν την έγχυση της CAR T θεραπείας, είναι η ύπαρξη των  $T_{regs}$  που προϋπάρχουν των CAR T cells και αναστέλλουν την δράση τους (Ghiringhelli et al., 2004). Έρευνες έχουν δείξει την σημασία της IL-12 για τον περιορισμό των ανοσοκατασταλτικών ιδιοτήτων των  $T_{regs}$  και την ανάγκη τροποποίησης των T λεμφοκυττάρων. Τροποποιημένα CAR T cells με συστηματική έκφραση IL-12 παρουσίασαν αυξημένη ανθεκτικότητα στην ανοσοκαταστολή των T ρυθμιστικών. Όμως η IL-12, με τον προφλεγμονώδη χαρακτήρα της, έχει φανεί ότι σχετίζεται και με αρκετές τοξικότητες οπότε χρειάζεται προσοχή και στο θέμα αυτό (Pegram et al., 2012). Γι' αυτό τον λόγο δοκιμάζονται CAR T cells και με έκφραση άλλων κυτοκινών όπως IL-18 που έδωσε ανωτέρα αποτελέσματα σε όγκους παγκρέατος και πνευμόνων σε αντίθεση με συμβατικά CAR T cells. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε μειωμένος αριθμός  $T_{regs}$  και M2 μακροφάγων στο TME που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με την ανοσοκαταστολή των δραστικών T λεμφοκυττάρων (Chmielewski & Abken, 2017).

Η δράση και η επιβίωση και των δραστικών και των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων ελέγχεται κατά κύριο λόγο από την IL-2 (Shameli et al., 2013). Η ρύθμιση λοιπόν της IL-2 ίσως φέρει θετικά αποτελέσματα προωθώντας τις κυτταρολυτικές ικανότητες των  $CD8^+$  T. Όμως τα CAR T cells παράγουν μεγάλες ποσότητες IL-2 κατά την ενεργοποίησή τους μέσα από την Lck κινάση της ενδοκυτταρικής περιοχής. Έτσι γεννάται η υπόθεση ότι λιγότερες ποσότητες IL-2 θα έχουν θετική επίδραση στα CAR T cells, καθώς θα περιορίσει την ανοσοκαταστολή από τα  $T_{regs}$ , οπότε στρεφόμαστε πάλι στην ίδια την δομή των CARs. CD28 συνδιέγερση των CAR T cells πυροδοτεί έκκριση IL-2 μέσα από την ενεργοποίηση της Lck. Οπότε φαίνεται ότι είναι απαραίτητη η τροποποίηση ή χρήση άλλων μορίων για την σηματοδότηση των CAR T

cells, όπως το 4-1BB που σχετίζεται με αυξημένο persistence ή ICOS που ωθεί σε περισσότερη έκκριση IL-17 και μειωμένη IL-2 (Guedan et al., 2014). Μια προσέγγιση τροποποίησης του CD28 και μετάλλαξη στην Lck κινάση, παρουσίασε αυξημένη αντικαρκινική ισχύ των CAR T cells σε μοντέλα ποντικών και περιορισμό της ανοσοκατασταλτικής δράσης των T<sub>regs</sub> μέσα από μείωση της IL-2 σε σχέση με τα CAR T cells με WT CD28 σηματοδότηση (Kofler et al., 2011). Άλλες έρευνες όμως έχουν αντίθετα ευρήματα ως προς την χρήση του CD28 και παρουσίασαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα των CAR T cells με CD28 σηματοδότηση στην ανοσοκαταστολή των T<sub>regs</sub> μέσω του TGFβ, που αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων. Επιπλέον φάνηκε ότι η IL-2 που πυροδοτείται από την ενεργοποίηση της Lck σε CD28 σηματοδότηση, είναι σημαντική για την αντιμετώπιση της αναστολής του πολλαπλασιασμού των T κυττάρων από το TGFβ (Koehler, Kofler, Hombach, & Abken, 2007). Αυτό φάνηκε και μέσα από την τροποποίηση της Lck (διαγραφή του Lck-binding motif) και έλλειψη IL-2 σε CAR T cells που δεν παρουσίασαν ανθεκτικότητα στο TGFβ. Βέβαια, άλλες κυτοκίνες όπως η IL-7 και IL-15 θα μπορούσαν να δράσουν αντί της IL-2, που διατηρεί την επιβίωση και δράση των T<sub>regs</sub> και να την αντικαταστήσουν σε μια IL-2 ανεξάρτητη σηματοδότηση. Ένας hybrid υποδοχέας IL-7 με σηματοδοτικές IL-2Rβ αλυσίδες (IL-7Rα/IL-2Rβ) σε CAR T cells με CD28 σηματοδότηση (CD28ΔLCK-ζ CAR T cells), παρείχε αυξημένη αποτελεσματικότητα σε TGFβ<sup>+</sup> όγκους (Golumba-Nagy, Kuehle, Hombach, & Abken, 2018). Άλλη προσέγγιση με μεγάλο ενδιαφέρον θα ήταν η δημιουργία IL-2 mutants που θα παρέχουν επιλεκτική σηματοδότηση σε τροποποιημένα CD8<sup>+</sup> T κυτταροτοξικά και λιγότερο σε T ρυθμιστικά (Sokolosky et al., 2018). Άλλη έρευνα παρουσίασε αυξημένη αποτελεσματικότητα των CAR T cells μέσω knockout του TGFBR2 με CRISPR/Cas9 σε TGFβ-rich στερεούς όγκους (N. Tang et al., 2020). Όλα τα παραπάνω δείχνουν την σημασία της δομής των CARs και τροποποίησή τους μέσα από συνδυαστικές προσεγγίσεις για τον περιορισμό της ανοσοκαταστολής.

## **B λεμφοκύτταρα και NK κύτταρα**

Τα B λεμφοκύτταρα που μπορεί να βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου δεν είναι πολυπληθή καθώς δεν παρατηρείται μεγάλη διείσδυση B κυττάρων στο TME. Μπορούν όμως να βρίσκονται στους λεμφαδένες γύρω από την ευρύτερη περιοχή του όγκου. Όμως αυτά τα B κύτταρα που έχουν εισβάλει στο TME, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην δημιουργία έκτοπων λεμφικών σχηματισμών που ονομάζονται τριτοταγείς λεμφικές δομές και προέρχονται από συσσωματώματα ανοσοκυττάρων σε μη λεμφικούς ιστούς. Αυτές οι δομές μπορεί να αποτελέσουν προγνωστικό δείκτη καρκίνου του μαστού, ωθηκών ή στο μελάνωμα. Βέβαια ο ρόλος τους στην κυτταροτοξικότητα των CD8<sup>+</sup> T μέσω IFNγ και η παραγωγή αντισωμάτων έχουν αντικαρκινικό χαρακτήρα. Αντίθετα, τα ρυθμιστικά B λεμφοκύτταρα μπορεί να συντελέσουν στην επιθετικότητα του όγκου μέσα από παραγωγή ανοσοκατασταλτικών IL-10 ή TGFβ (Anderson & Simon, 2020; Yuen, Demissie, & Pillai, 2016). Η παραγωγή TGFβ από B ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα μπορεί να ενισχύσει την διαφοροποίηση των naive CD4<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων σε Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> αναστέλλοντας με τον τρόπο αυτό την κυτταρολυτική δράση των CD8<sup>+</sup> κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων (Lund, 2008; Olkhanud et al., 2011). Η παρουσία των NK cells στο μικροπεριβάλλον του όγκου φαίνεται να μην επηρεάζει δραματικά την κυτταρολυτική



αντικαρκινική δράση καθώς είναι πιο αποτελεσματικά όταν δρουν στην κυκλοφορία του αίματος και όχι μετά την εξαγγείωσή τους στο TME. Τα NK κύτταρα στην κυκλοφορία του αίματος μπορούν να μπλοκάρουν την μεταφορά καρκινικών κυττάρων από το αίμα σε κοντινούς ή και μακρινούς ιστούς, μπλοκάροντας έτσι την μετάσταση (Larsen, Gao, & Basse, 2014).

### **Μακροφάγα**

Μη ειδικά κύτταρα της εγγενούς ανοσολογικής απόκρισης μπορούν να βρίσκονται στο TME με ιδιότητες που προωθούν ή περιορίζουν τον όγκο. Μακροφάγα με προφλεγμονώδη M1 και M2 φαινότυπο που καταστέλλει την απόκριση παρατηρούνται στο TME. Όμως το TME μέσα από υποξία και παραγωγή κυτοκινών όπως IL-4 προωθεί την ύπαρξη του M2 φαινότυπου με τις ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Έτσι το ίδιο το TME προάγει, μέσω των M2 μακροφάγων που έχουν εισβάλει, την ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου. Τα μακροφάγα αποτελούν τον μεγαλύτερο πληθυσμό ανοσοκυττάρων που εισέρχεται στον όγκο οπότε επηρεάζουν άμεσα την κλινική εικόνα του ασθενή και την απόκριση στην θεραπεία. προωθούν την ογκογένεση εκκρίνοντας αυξητικούς παράγοντες που ενεργοποιούν τον καρκινικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Παίρνουν μέρος στην αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας και επιδρούν σημαντικά στην μετάσταση, παράγοντας αγγειογενετικούς παράγοντες. Τα tumor associated macrophages (TAMs) σχετίζονται άμεσα με τα αιμοφόρα αγγεία του TME καθώς παράγουν VEGF-A ωθώντας έτσι την αγγειογένεση. Επιπλέον εκκρίνουν ROS και μονοξειδίο του αζώτου που επιφέρουν γενετική αστάθεια στα καρκινικά κύτταρα. Παράλληλα καταστέλλουν τα T λεμφοκύτταρα μέσα από έκκριση IL-10 και TGFβ, προσταγλανδίνης και έκφραση checkpoint ligands όπως PD-L1. Μια από τις πιο σημαντικές ιδιότητές τους είναι ότι στρατολογούν  $T_{regs}$  στο TME με ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες της απόκρισης των  $CD8^+$  T κυτταροτοξικών. Τα TAMs οπότε, αποτέλεσαν από νωρίς στόχο ανοσοθεραπείας για τον περιορισμό των ογκογενετικών τους ιδιοτήτων (Biswas, Allavena, & Mantovani, 2013; Vitale, Manic, Coussens, Kroemer, & Galluzzi, 2019). Σε μια έρευνα η εξάλειψη των TAMs μέσα από ενεργοποίηση CSF-1R αναστολέα συσχετίστηκε με την αύξηση του αριθμού  $CD8^+$  κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων στο TME, βελτιωμένη αντικαρκινική δράση αλλά και καλύτερη απόκριση σε θεραπεία με checkpoint inhibitors (Peranzoni et al., 2018).

Στην CAR T cell θεραπεία έχει φανεί ο ρόλος των TAMs καθώς περιορίζουν πολύ την αντικαρκινική δράση. Όμως ο ρόλος των μακροφάγων M1 φαινότυπου μπορεί να είναι κομβικός για ένα καλό αποτέλεσμα μέσα από φαγοκυττάρωση και έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως TNFα και IL-12. CAR T cells τροποποιημένα για την έκφραση IFNγ και GM-CSF κατά την ενεργοποίησή τους έδειξαν να στρατολογούν μακροφάγα με αντικαρκινική δράση στο TME, παρέχοντας έτσι θετικά αποτελέσματα και αντικαρκινική ισχύ (Spear, Barber, Rynda-Apple, & Sentman, 2012). Μια προσέγγιση αποτελεί η χρήση της σύνδεσης του CD47 που εκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα, με το SIRPα των μακροφάγων, κατά του ίδιου του όγκου. Έτσι θεωρείται δυνατόν μέσα από CAR T cells που εκφράζουν CD47-blocking nanobodies, να ανασταλεί το “don’t eat me” σήμα των καρκινικών κυττάρων, μέσα από το μπλοκάρισμα της CD47 σύνδεσης, με αποτέλεσμα τα μακροφάγα να αρχίσουν την φαγοκυττάρωση του όγκου (Xie et al., 2020). Άλλες έρευνες επικεντρώθηκαν στον επαναπρογραμματισμό των ανοσοκατασταλτικών TAMs με M2 φαινότυπο, σε πιο M1-

like φαινότυπο με αντικαρκινικές ιδιότητες. Άλλοι βέβαια πρότειναν την ολοκληρωτική εξάλειψη των TAMs στο TME (Rodriguez-Garcia et al., 2020). Ακόμα μια προσέγγιση αποτελεί η σύνδεση του CD40 που εκφράζεται σε APCs όπως τα DCs και σε μακροφάγα, με το CD40L για την παραγωγή IL-12. CAR T cells με συστηματική έκφραση CD40L παρουσίασαν αυξημένη δράση μέσω προαγωγής έκκρισης IL-12 από DCs και μακροφάγα (Curran et al., 2015). Χρήση θεραπείας αναστολέα κινασών sorafenib σε συνδυασμό με έγχυση CAR T cells, οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή IL-12 από μακροφάγα και ισχυρότερη αντικαρκινική απόκριση (X. Wu et al., 2019). Τέλος μια ακόμα προσέγγιση αποτελεί η στόχευση αντιγόνων στα ίδια τα TAMs από τα CAR T cells με σκοπό τον περιορισμό της ανοσοκαταστολής. CD123 στόχευση που εκφράζεται και σε καρκινικά κύτταρα και σε TAMs, φαίνεται να παρέχει θετικά αποτελέσματα σε NHL, παρά το ισχυρό ανοσοκατασταλτικό του μικροπεριβάλλον (Ruella et al., 2017).

### **Μυελικά Κατασταλτικά κύτταρα**

Τα myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) αποτελούν ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του TME με μεγάλη σημασία στην ανοσολογική απόκριση. Πρόκειται για έναν ετερογενή πληθυσμό ανώριμων μυελικών κυττάρων που έχουν ιδιαίτερα ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Ο μεγάλος αριθμός τους στο TME έχει ταυτιστεί με μη αποτελεσματική απόκριση των ανοσοκυττάρων, με κύριο στόχο τα T λεμφοκύτταρα και την κακή εικόνα του ασθενή. Η ανάπτυξή τους στο TME προωθείται από πολλούς παράγοντες που περιλαμβάνουν προσταγλανδίνες, stem cell factor, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), GM-CSF, IL-6 και VEGF. Διαχωρίζονται σε δυο γενικές κατηγορίες: μονοπύρηνια και πολυμορφοπύρηνια MDSCs, αποτελώντας προγονικά κύτταρα των TAMs και των tumor-associated neutrophils (TANs) αντίστοιχα. Όπως είναι λογικό μέσα από τον ανοσοκατασταλτικό τους χαρακτήρα προάγουν την ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου (Kumar, Patel, Tcyganov, & Gabrilovich, 2016; Marvel & Gabrilovich, 2015). Οι ιδιότητες τους έχουν αρκετά κοινό χαρακτήρα με τα TAMs, εκκρίνοντας ROS και NO, παραγωγή IL-10 και TGFβ, στρατολόγηση των ρυθμιστικών T κυττάρων στο TME. Επιπλέον, κατέχουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό αμινοξέων όπως αργινίνη, τρυπτοφάνη και κυστεΐνη, επιδρώντας στον πολλαπλασιασμό και τις λειτουργίες των T λεμφοκυττάρων. Η μείωση της L-αργινίνης in vitro εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων, ο οποίος και διακόπτεται στη φάση G0-G1 του κυτταρικού κύκλου, επηρεάζει αρνητικά τις σηματοδοτικές CD3ζ αλυσίδες του TCR και παράλληλα μειώνει την παραγωγή κυτοκινών περιορίζοντας το σήμα ενεργοποίησης. Έτσι φαίνεται ξεκάθαρα η αρνητική επίδραση των MDSCs στην δράση των T λεμφοκυττάρων (Gabrilovich & Nagaraj, 2009; Taheri et al., 2001).

Γι' αυτό τον λόγο και η χαμηλή παρουσία αυτών των κυττάρων στο TME σχετίζεται με καλύτερα αποτελέσματα και πιο ισχυρή απόκριση στην θεραπεία και στον χώρο των CAR T cells. Για παράδειγμα, η χρήση θεραπείας αντισωμάτων για την εξάλειψη των MDSCs και χορήγηση anti-CEA CAR T cells σε ποντίκια με μετάσταση καρκίνου παχέος εντέρου στο ήπαρ, οδήγησε σε βελτιωμένη αποτελεσματικότητα (Burga et al., 2015). Σε άλλη έρευνα, anti-PD-L1 θεραπεία αντισωμάτων σε συνδυασμό με CAR T cells παρουσιάστηκε μειωμένος αριθμός MDSCs στο TME με αποτέλεσμα την αυξημένη αντικαρκινική ισχύ της θεραπείας (John et al., 2013). Η πιο άμεση στόχευση

των MDSCs φαίνεται να συνδέεται και με μικρότερο αριθμό των ανοσοκατασταλτικών αυτών κυττάρων στο TME. Το VEGFR-2 καθώς εκφράζεται και στο ενδοθήλιο και στα MDSCs αποτέλεσε στόχος των CAR T cells με αποτέλεσμα την μείωση των MDSCs στο TME και της αγγείωσης του όγκου (Chinnasamy et al., 2012). Άλλη έρευνα επικεντρώθηκε στην τροποποίησή της δομής του CAR για να είναι πιο ανθεκτικό το τροποποιημένο T λεμφοκύτταρο στην ανοσοκαταστολή από τα MDSCs. Μέσα από μεταλλάξεις στην σηματοδότηση με CD28 οδήγησαν στην δημιουργία ενός πιο ανθεκτικού CAR T cell και παρατηρήθηκε αυξημένος ο αριθμός τους στο περιφερικό αίμα ποντικών in vivo (Rodriguez-Garcia et al., 2020).

### **Ουδετερόφιλα**

Ο ρόλος των ουδετερόφιλων που βρίσκονται στο TME παρουσιάζει μια εξάρτηση από το είδος και το στάδιο του όγκου. Τα tumor-associated neutrophils (TANs) μπορούν να κατηγοριοποιηθούν και αυτά σε δυο κατηγορίες ανάλογα με τον φαινότυπο τους. N1 με αντικαρκινικό χαρακτήρα και N2 με ογκογενετικό χαρακτήρα. Στα αρχικά στάδια ανάπτυξης του όγκου τα ουδετερόφιλα προάγουν την φλεγμονή μέσα από την παραγωγή κυτοκινών και reactive oxygen species (ROS) στην προσπάθεια να περιορίσουν τον όγκο προάγοντας τον κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων μέσα από απόπτωση (Masucci, Minoroli, & Carriero, 2019). Σε επόμενα στάδια της εξέλιξης του όγκου, τα ουδετερόφιλα τροποποιώντας την εξωκυττάρια μήτρα (extracellular matrix, ECM) μέσα από έκκριση VEGF και matrix metalloprotease (MMP) -9 προωθούν την αγγειογένεση, εξέλιξη του όγκου και μετάσταση (Deryugina et al., 2014). Σε CAR T cell θεραπεία με στόχο το CEA, μεγαλύτερος αριθμός ουδετερόφιλων από αυτόν των T λεμφοκυττάρων φάνηκε να σχετίζεται με μειωμένη αποτελεσματικότητα σε καρκίνο παχέος εντέρου με μετάσταση στο ήπαρ (Saied et al., 2014).

### **Δενδριτικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα**

Ο γενικός ρόλος των δενδριτικών κυττάρων είναι η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού μέσω της επεξεργασίας αντιγονικών πεπτιδίων και της αντιγονοπαρουσίασης σε naïve T λεμφοκύτταρα, με σκοπό την ενεργοποίησή τους. Όμως, η ανάπτυξη και η εξέλιξη των όγκων σχετίζεται με μια σειρά μηχανισμών που δίνουν την ικανότητα στα καρκινικά κύτταρα να ξεφεύγουν από την αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση. Ένας από αυτούς του μηχανισμούς είναι και η παρεμπόδιση της λειτουργικής διαφοροποίησης και ενεργοποίησης των DCs. Τα DCs στο TME μπορούν να παρουσιάσουν διαφορετικούς φαινότυπους με αντικαρκινικές αλλά και ικανότητες υπέρ της ανάπτυξης του όγκου. Το TME τελικά, μέσα από παραγωγή κυτοκινών, ωθεί τα δενδριτικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα να είναι ανεκτικά προς τα καρκινικά κύτταρα προασπίζοντας έτσι την ογκογένεση και την αναστολή της ανοσολογικής απόκρισης των T δραστικών κυττάρων στο TME (Banchereau & Steinman, 1998; Y. Ma, Shurin, Peiyuan, & Shurin, 2013). Ανάλογα με την εισβολή ανοσοκυττάρων στο TME μπορούμε να δημιουργήσουμε 3 γενικές κατηγορίες με τα ανοσοκύτταρα να είναι κατανεμημένα στο σύνολο του TME και να είναι δραστηριά, τα ανοσοκύτταρα να βρίσκονται περιφερειακά του όγκου ή και καθόλου στην περιοχή του όγκου, υποδηλώνοντας καμία ανοσολογική απόκριση στην ύπαρξη του (Anderson & Simon, 2020).

## Στρωματικά κύτταρα

Ένα από τα κύρια και χαρακτηριστικά συστατικά του TME που διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στις ιδιότητες του, αποτελούν τα στρωματικά του κύτταρα. Κύτταρα δηλαδή με υποστηρικτικό ρόλο που στρατολογούνται από το στρώμα του ενδογενούς γειτονικού ιστού, με σημαντική συμβολή στην ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου. Η κατανομή και η σύνθεση των στρωματικών κυττάρων μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το είδος του όγκου, αλλά γενικά περιλαμβάνει τους εξής χαρακτηριστικούς τύπους κυττάρων: ενδοθηλιακά κύτταρα αγγείων, ινοβλάστες, λιποκύτταρα και αστεροειδή ηπατικά κύτταρα (περικύτταρα) (S. Guo & Deng, 2018; Mao, Keller, Garfield, Shen, & Wang, 2013).

## Ενδοθηλιακά κύτταρα

Στα αρχικά στάδια ανάπτυξης του όγκου, η ανταλλαγή αερίων και μεταφορά θρεπτικών ουσιών στα κύτταρα του όγκου πραγματοποιείται μέσω παθητικής διάχυσης. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα που βασίζονται στην διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης για την παραγωγή ATP, τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν το Warburg effect. Προτίμηση δηλαδή της λιγότερο αποτελεσματικής διαδικασίας της γλυκόλυσης για την παραγωγή ATP ακόμα και παρουσία οξυγόνου. Η αλλαγή αυτή βέβαια ακολουθεί την πτώση των επιπέδων οξυγόνου με την αύξηση του όγκου, με αποτέλεσμα το TME να γίνεται υποξικό και όξινο, λόγω συσσώρευσης μεταβολικών αποβλήτων. Η υποξία στο TME πυροδοτεί τον hypoxia inducible factor 1α (HIF-1α), ενός μεταγραφικού παράγοντα κομβικό για τον συντονισμό της κυτταρικής απόκρισης σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου. Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF υδρολύεται σε κανονικές συνθήκες οξυγόνου, αλλά ομοίως το υποξικό περιβάλλον του όγκου λόγω του ταχύτατου κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της ελλιπούς αγγείωσης απενεργοποιεί τις υδρολάσες και ωθεί τον σχηματισμό μεταγραφικών συμπλόκων στον πυρήνα μέσω σύνδεσης του HIF σε συγκεκριμένες περιοχές που ονομάζονται hypoxia response elements (HREs). Τα HREs βρίσκονται σε υποκινητές γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ως απάντηση στην υποξία όπως ο VEGF-A. Ο HIF προάγει την αγγειογένεση ωθώντας έκκριση EGF και VEGF από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία μεταναστεύουν για την δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων. Καλά οξυγονωμένα κύτταρα παρουσιάζουν ρυθμό πολλαπλασιασμού όταν βρίσκονται πολύ κοντά σε λειτουργικά αιμοφόρα αγγεία, ενώ καρκινικά υποξικά κύτταρα, 100-200 μm μακριά από αιμοφόρα αγγεία και όταν βρίσκονται κοντά ή σε νεκρωτικές περιοχές, έχουν συγκριτικά αργό πολλαπλασιασμό (Y. Li, Zhao, & Li, 2021; Weljie & Jirik, 2011; Wicks & Semenza, 2022; Ziello, Jovin, & Huang, 2007).

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα επιπλέον μπορούν να υιοθετήσουν μεσεγχυτικό φαινότυπο μέσω endothelial to mesenchymal transition (EndTM), χάνοντας παράλληλα τον ενδοθηλιακό τους φαινότυπο. Η συνεισφορά του EndTM στην εμφάνιση μετάστασης φαίνεται να είναι σημαντική καθώς διαταράσσει το ενδοθήλιο των αγγείων επιτρέποντας πιο εύκολη εξαγγείωση καρκινικών κυττάρων από την κυκλοφορία του αίματος και εισβολή σε άλλους ιστούς με αποτέλεσμα τις μεταστάσεις (Clere, Renault, & Corre, 2020). In vivo η υποξία έχει δείξει ότι περιορίζει την ανάπτυξη των CAR T cells και ωθεί προς φαινότυπους κεντρικής μνήμης. Προσπάθειες για τον έλεγχο έκφρασης του CAR σε υποξικά περιβάλλοντα όγκων έχουν γίνει μέσω χρήσης HRE

περιοχών στον υποκινητή του CAR και μέσω σύντηξης HIF επικρατειών στην ενδοκυτταρική περιοχή του CAR. Με τον τρόπο αυτό θεωρητικά θα μπορούσε να υπάρχει μια ελεγχόμενη έκφραση των CARs μόνο κάτω από καταστάσεις υποξίας, ειδικά δηλαδή στο TME, ενώ υπο φυσιολογικές τιμές οξυγόνου ο CAR θα υδρολύεται. Το εγχείρημα αυτό ίσως βοηθήσει σε επιλεκτική αναγνώριση μόνο καρκινικών κυττάρων λόγω της περιορισμένης έκφρασης του CAR σε κανονικές συνθήκες οξυγόνου όπως συμβαίνει στους υγιείς ιστούς (Liao et al., 2020). Παράλληλα η στόχευση του VEGF, φαίνεται να έστρεψε την αγγείωση προς φυσιολογικά επίπεδα και προώθησε την είσοδο των CAR T cells στον όγκο. Στο μελάνωμα το μπλοκάρισμα του VEGF παρουσιάζει καλά αποτελέσματα και σε συνεργασία με VEGF-redirected CAR T cells έδειξαν θετικά στοιχεία σε προκλητικά μοντέλα. Anti-VEGFR2 CAR T cells με έκφραση IL-12 φαίνεται να επηρέασε θετικά και να ώθησε σε υποχώρηση του όγκου (Chinnasamy et al., 2012).

Η υποξία προάγει τις ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες του TME καθώς όπως φαίνεται σε συνδυασμό με τον μεταγραφικό παράγοντα HIF, επάγει την αύξηση έκφρασης PD-L1 και την στρατολόγηση ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων στο TME με αποτέλεσμα τον περιορισμό απόκρισης από τα άλλα T λεμφοκύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες προσταγλανδίνης E2 κατά το υποξικό καθεστώς στο TME αναστέλλοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων μέσα από την ενεργοποίηση των G protein-coupled receptors και της κινάσης πρωτεΐνης A (J. J. Lee et al., 2010; Sakaguchi, Miyara, Costantino, & Hafler, 2010). Η στόχευση του VEGF φαίνεται λογική, καθώς η ανώριμη αγγείωση του όγκου θέτει προβλήματα στην λειτουργία των CAR T cells και την εξαγγείωση τους στο περιβάλλον του όγκου. Άλλοι στόχοι όπως το VEGFR2, VEGFR1, PSMA έχουν χρησιμοποιηθεί για τον περιορισμό της αγγείωσης. Αυτό σε συνεργασία με το ότι τα μόρια αυτά εκφράζονται και σε καρκινικά κύτταρα και σε ανοσοκατασταλτικά ανοσοκύτταρα (MDSCs) του TME μπορεί να φανεί θετικό για την έκβαση των θεραπειών (J. Yang, Yan, & Liu, 2018).

### **Ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο**

Οι cancer associated fibroblasts (CAFs) αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι του στρώματος του όγκου με ποικίλες λειτουργίες που δρουν υπέρ του όγκου. Κύριος ρόλος του, είναι η σύνθεση και αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής μήτρας (extracellular matrix, ECM) και η άμεση επικοινωνία των καρκινικών κυττάρων με το TME. Οι CAFs συνήθως προέρχονται από φυσιολογικές ινοβλάστες του γύρω ιστού. Τα καρκινικά και στρωματικά κύτταρα του TME παράγουν αυξητικούς παράγοντες όπως: TGFβ, platelet derived growth factor (PDGF) και FGF2, τροποποιώντας τις ινοβλάστες σε CAFs (Calon, Tauriello, & Batlle, 2014; Louault, Li, & DeClerck, 2020). Άλλη εναλλακτική πηγή προέλευσης των CAFs αποτελούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω EndTM, παίρνοντας μεσεγχυματικό φαινότυπο και μέσω του TGFβ και bone morphogenetic protein (BMP) μετατρέπονται σε CAF-like κύτταρα. Η διαταραχή αυτή στο ενδοθήλιο σε συνδυασμό με έκκριση TGFβ που προωθεί την αγγειογένεση και MMP-3 που αποδομεί την E-cadherin, οι CAFs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εισβολή καρκινικών κυττάρων στους γύρω και μακρινούς ιστούς, οδηγώντας σε μεταστάσεις (Iwano et al., 2002; Zheng et al., 2009). Οι CAFs φαίνεται στα αρχικά στάδια του όγκου να προσπαθούν να τον περιορίσουν, αλλά αργότερα δουλεύουν υπέρ της ανάπτυξής του, παρέχοντας του παράλληλα τις ανοσοκατασταλτικές τους

ιδιότητες. Οι CAFs παράγουν το μεγαλύτερο μέρος των εξωκυτταρικών συστατικών του TME. Παράγουν δηλαδή αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες και την ECM. Η αναδιαμόρφωση της ECM από τις CAFs της προσδίδει ιδιότητες που σχετίζονται με την επιβίωση και ανάπτυξη του όγκου καθώς και περιορισμό της ανοσολογικής απόκρισης εναντίον του όγκου. Με τον τρόπο αυτό οι CAFs σμιλεύουν τους πληθυσμούς των ανοσοκυττάρων του TME παράγοντας κυτοκίνες, που επιλεκτικά μπλοκάρουν την δράση των T λεμφοκυττάρων ειδικά για τον όγκο, ενώ δρουν υπέρ της επικράτησης ανοσοκυττάρων που θα προσδώσουν στο TME περισσότερες ανοσοκατασταλτικές ικανότητες (Louault et al., 2020; Sahai et al., 2020).

Στο πλαίσιο των CAFs και καθώς φαίνεται η σημαντικότητα του χαρακτήρα τους για το TME, την εξωκυττάρια μήτρα και τον ίδιο τον όγκο ίσως θα πρέπει να αποτελέσουν στόχο θεραπείας. Η fibroblast activation protein (FAP) εκφράζεται ευρέως σε καρκινικούς ινοβλάστες και η εξάλειψη των FAP<sup>+</sup> κυττάρων οδήγησε σε μείωση των ανοσοκατασταλτικών ανοσοκυττάρων στο TME και βελτίωση της αντικαρκινικής δράσης των CD8<sup>+</sup> T κυτταροτοξικών. Η αυξημένη έκφραση FAP έχει συσχετιστεί και με χειρότερα κλινικά αποτελέσματα σε μερικούς όγκους όπως στον καρκίνο του παγκρέατος. Όμως η έκφραση FAP και σε άλλα φυσιολογικά κύτταρα όπως μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών, λιποκύτταρα και παγκρεατικά κύτταρα ίσως περιορίσει την αποτελεσματικότητα της στόχευσης των FAP των ινοβλαστών στο στρώμα του όγκου, καθώς η εξάλειψη FAP σε διαγονιδιακά ποντίκια παρουσίασε υποπλασία μυελού των οστών, μείωση σωματικού βάρους, αναιμία και τοξικότητα παγκρέατος. Οι θεραπείες με στόχο των FAP των CAFs έχουν παράξει θετικά αποτελέσματα στην στόχευση του TME, αλλά και σοβαρές τοξικότητες, κάτι που πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπ' όψιν για το μέλλον (Hamson, Keane, Tholen, Schilling, & Gorrell, 2014; Lo et al., 2017; Y. Zhang & Ertl, 2016).

### **Λιποκύτταρα**

Τα λιποκύτταρα κατέχουν σημαντική θέση στην προώθηση του όγκου εκκρίνοντας ένζυμα, ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες στο TME. Η συμβολή τους φαίνεται κυρίως στον καρκίνο του μαστού. Ο ιστός του μαστού αποτελείται κατά ένα μεγάλο μέρος από λευκό λιπώδη ιστό. Άρα τα λιποκύτταρα κατέχουν σημαντικό ρόλο στο TME του καρκίνου του μαστού. Μια από τις σημαντικές δράσεις των λιποκυττάρων είναι η έκκριση λεπτίνης. Η ορμόνη αυτή επηρεάζει άμεσα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού και ταυτόχρονα ενεργοποιεί μακροφάγα, που είδαμε ότι μέσω της προώθησης του M2 φαινότυπου από το TME, καταστέλλουν την ανοσολογική απόκριση. Βέβαια παρατηρείται μια δυναμική σχέση αλληλεξάρτησης του όγκου με τα λιποκύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα του μαστού μπορούν να προάγουν λιπόλυση, με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων λιπαρών οξέων, που μπορεί να αποτελέσει πηγή παραγωγής ενέργειας για τα καρκινικά κύτταρα και τον σχηματισμό των μεμβρανών τους. Τα λιποκύτταρα επιπλέον μπορούν να τροποποιήσουν την ECM μέσα από την παραγωγή μεταλλοπρωτεασών (MMP-1, MMP-7, MMP-10). Μέσα από παρακρινή σηματοδότηση, ο λευκός λιπώδης μπορεί να προκαλέσει μεταστάσεις σε πνεύμονες και ήπαρ (Anderson & Simon, 2020; Pallegar & Christian, 2020; Sánchez-Jiménez, Pérez-Pérez, de la Cruz-Merino, & Sánchez-Margalet, 2019; Q. Wu et al., 2019).

### **Αστεροειδή περικύτταρα (Stellate Cells)**

Τα αστεροειδή ηπατικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από το καθεστώς ηρεμίας τους (quiescence) και την επακόλουθη ενεργοποίησή τους μετά από τραυματισμό του ιστού. Είναι περικύτταρα, μεσεγγυματικής προέλευσης, τα οποία όταν ενεργοποιούνται, εισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο και μετατρέπονται σε μυοβλάστες. Βρίσκονται εντός του ήπατος, όπου και μπορούν να αποτελέσουν μέχρι και το 15% της μάζας του οργάνου, καθώς και στο πάγκρεας. Τα αστεροειδή ηπατικά κύτταρα, στο TME του καρκινώματος των ηπατοκυττάρων, ενεργοποιούνται μέσω του TGFβ και μπορούν να τροποποιήσουν την ECM. Με τον τρόπο αυτό, μέσω VEGF-A και MMP-2 προωθούν την αγγειογένεση. Ένας κύριος ρόλος των κυττάρων αυτών είναι και η εναπόθεση Βιταμίνης Α σε σταγονίδια λιπιδίων τα οποία και χρησιμοποιούνται στο καρκίνωμα του ήπατος για την παραγωγή ECM και αναδιαμόρφωσης της μέσω παραγωγής μεταλλοπρωτεασών. Κατά το αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος τα παγκρεατικά αστεροειδή κύτταρα όταν βρίσκονται σε ηρεμία παράγουν δεσμίνη και βιμεντίνη, πρωτεΐνες της ECM η οποία διακατέχεται από αρκετά πυκνό συνδετικό ιστό. Ενεργοποιημένα παγκρεατικά αστεροειδή κύτταρα προάγουν την δεσμοπλαστική αντίδραση και αναδιαμόρφωση της ECM συντελώντας παράλληλα στην μετάσταση (Barry et al., 2020; Heindryckx & Gerwins, 2015; Roife, Sarcar, & Fleming, 2020).

### **Μη κυτταρικά συστατικά του μικροπεριβάλλοντος του όγκου**

#### **Εξωκυττάρια Μήτρα (ECM)**

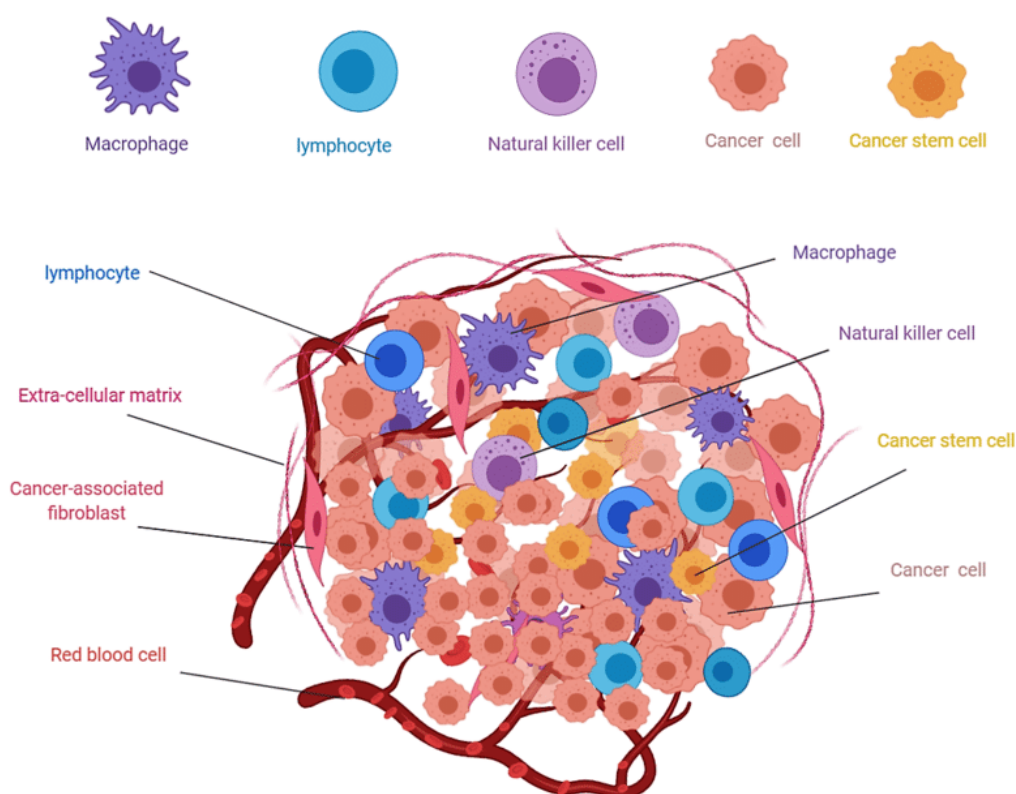
Το πιο σημαντικό μη κυτταρικό συστατικό του TME κατέχοντας ταυτόχρονα και δομικό, αλλά και λειτουργικό ρόλο στο TME, αποτελεί η εξωκυττάρια μήτρα. Η ECM παρέχει ένα φυσικό κατάλυμα για τα κυτταρικά συστατικά του TME, αλλά ταυτόχρονα προωθεί και τις ιδιότητες του όγκου. Οι στερεοί όγκοι περιέχουν μεγάλες ποσότητες ECM, αποτελώντας έτσι ένα από τα πιο χαρακτηριστικά εμπόδια για την μετακίνηση εξειδικευμένων T λεμφοκυττάρων στο TME. Η ECM μπορεί να κατέχει μέχρι και το 60% της μάζας του όγκου, διαμορφώνοντας έτσι την μορφή και τις ιδιότητές του. Η ECM αποτελείται κυρίως από ινώδεις πρωτεΐνες, όπως το κολλαγόνο, ελαστίνη, φιμπρονεκτίνη, λαμινίνη και πρωτεογλυκάνες (Anderson & Simon, 2020). Οι μεγάλες ποσότητες κολλαγόνου, σε συνδυασμό με τις CAFs έχουν ως αποτέλεσμα την δεσμοπλασία, την αναδιαμόρφωση δηλαδή της ECM με την εμφάνιση του καρκίνου, προωθώντας έτσι τις ογκογενετικές ιδιότητες του TME. Οι μηχανισμοί μεταφοράς, οι μεταβολικές διαδικασίες, η οξυγόνωση και η ανοσογονικότητα ελέγχονται από την ECM που ενώ σε φυσιολογικούς ιστούς έχει αντικαρκινικές ιδιότητες, η αναδιαμόρφωσή της από τις CAFs και τα κυτταρικά συστατικά του TME που παίρνουν μέρος στον σχηματισμό της, προωθεί την ογκογένεση και καθορίζει την απόκριση στην θεραπεία, καθώς μια μεγάλη και πυκνή ποσότητα της ECM σε όγκους περιορίζει την μετακίνηση ουσιών στο εσωτερικό του όγκου μέσω φυσικών φραγμών (Brassart-Pasco et al., 2020). Η ECM συντονίζει τις ιδιότητες του TME στην περιοχή του όγκου, αλλά ρυθμίζει και την μετάσταση μέσω της epithelial to mesenchymal transition (ETM) διαδικασίας, κατά την οποία παρατηρείται ένας πιο βλαστικός χαρακτήρας στον όγκο και ευκολία μετακίνησης και εισβολής των καρκινικών κυττάρων σε άλλους ιστούς (Jing, Han, Zhang, Liu, & Wei, 2011). Οι μεταλλοπρωτεάσες που διασπούν τις πρωτεΐνες της ECM, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αναδιαμόρφωσή της ECM,

την εξέλιξη του όγκου και την μετάσταση (Brassart-Pasco et al., 2020). Η ECM δρα ως ένας χώρος συσσώρευσης κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων, όπως TGFβ, EGF, VEGF, PDGFB με συνέπειες την αγγειογένεση και την εξέλιξη του όγκου. Τα T λεμφοκύτταρα κατά την εξαγγείωσή τους πρέπει να αποδομήσουν τα δομικά συστατικά της υποενδοθηλιακής βασικής μεμβράνης και της εξωκυττάριας μήτρας (Brassart-Pasco et al., 2020). Η εξωκυττάρια μήτρα, στο μικροπεριβάλλον του όγκου, αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εμπόδια κατά την είσοδο των CAR T cells στον όγκο, καθώς μια πλούσια σε κολλαγόνο και άλλες ινώδεις πρωτεΐνες εξωκυττάρια μήτρα σχετίζεται και με μειωμένο αριθμό TILs. Οπότε και τα CAR T cells θα πρέπει να έχουν την δυνατότητα να την διαπεράσουν αποδομώντας τις πρωτεογλυκάνες της ECM, heparan sulfate proteoglycans (HSPGs). Για τον λόγο αυτό, η έκφραση του ενζύμου heparanase (HPSE) που αποδημεί τις πρωτεογλυκάνες HSPGs της ECM, φαίνεται επιτακτική ανάγκη. In vitro τροποποιημένα tumor-specific T κύτταρα με έλλειψη HPSE, παρουσίασαν ελάχιστη αντικαρκινική δράση σε όγκους με πλούσιο στρώμα. Αντίθετα η έκφραση του ενζύμου προάγει την εισχώρηση των CAR T cells στον όγκο (Caruana et al., 2015).

### **Εξωσώματα**

Τα εξωσώματα είναι μικροκυστίδια μεταφοράς πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και λιπιδίων παίρνοντας έτσι μέρος στην αναδιαμόρφωσή της ECM. Έτσι φαίνεται η άμεση λειτουργία τους ως μεταφορικά και σηματοδοτικά μόρια για την επικοινωνία του TME με τα καρκινικά κύτταρα. Φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση και την μετάσταση, λόγω τις ικανότητας μεταφοράς μορίων ανάμεσα στα κύτταρα. Στο γλοίωμα, τα εξωσώματα έχει παρατηρηθεί ότι μπορούν να μεταφέρουν EGFRvIII, να συνενώνονται με τις μεμβράνες που κυττάρων που δεν διαθέτουν αυτόν τον υποδοχέα και να τα τροποποιούν δίνοντάς τους καρκινικές ιδιότητες (da Costa et al., 2021; J. Dai et al., 2020).





**Εικόνα 9:** Σχηματική απεικόνιση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (TME). Κυτταρικά (ανοσοκύτταρα, καρκινικά κύτταρα, κύτταρα του στρώματος) και μη κυτταρικά συστατικά (στρώμα και εξωκυττάρια μήτρα) του TME (Hassan & Seno, 2020)

### CAR T cells σε στερεούς όγκους ανά ιστολογική προέλευση

Οι στερεοί όγκοι χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια, γεγονός που φαίνεται και από το ότι μια θεραπεία δεν ταιριάζει στα τόσα ποικίλα είδη όγκων. Έτσι και στον χώρο των CAR T cells απαιτείται ιδιαίτερη διερεύνηση για την αποσαφήνιση των ιδιοτήτων του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, την έκφραση των μορίων στόχων και την προσέγγιση για την σωστή αποτελεσματικότητα με όσο το δυνατόν λιγότερες τοξικότητες, για την ασφάλεια του ασθενή. Οι προσεγγίσεις είναι πολλές και θετικά αποτελέσματα φαίνεται να υπάρχουν, αλλά είναι ακόμα λίγα για να πούμε με ακρίβεια τι μπορεί να συμβεί στο μέλλον, ως προς την αποτελεσματική μεταφορά της CAR T θεραπείας στην καταπολέμηση των στερεών όγκων (D'Aloia et al., 2018). Ακολουθούν μερικές χαρακτηριστικές προσεγγίσεις της CAR T θεραπείας σε στερεούς όγκους.

### Καρκίνος πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα κατέχει την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης και είναι η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Το γεγονός αυτό καθιστά απαραίτητη την αντιμετώπισή του και πολλές κλινικές μελέτες ανοσοθεραπείας παρατηρούνται για το θέμα αυτό. Υπάρχουν δυο κύριοι τύποι του καρκίνου αυτού και είναι ο μικροκυτταρικός, που εμφανίζεται κυρίως σε άτομα με ιστορικό καπνίσματος και ο μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, που αφορά το 85% όλων των διαγνωσμένων

καρκίνων του πνεύμονα. Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, non-small cell lung cancer (NSCLC), είναι ένας από τους καρκίνους με την μεγαλύτερη θνησιμότητα που παρατηρείται (Thai, Solomon, Sequist, Gainor, & Heist, 2021).

Κυρίοι στόχοι του NSCLC αποτελούν: EGFR, MSLN, MUC1, CEA, PD-L1, prostate stem cell antigen (PSCA), ROR1 και HER2 (Zhong, Cui, Liu, & Chen, 2020). Ενδιαφέρον παρουσιάζει μια Phase I κλινική μελέτη πάνω σε ανεπτυγμένο EGFR<sup>+</sup> NSCLC, με χρήση αυτόλογων CXCR5-modified anti-EGFR CAR T cells (ClinicalTrials.gov: NCT04153799). Άλλη προσέγγιση με διπλό χαρακτήρα, αποτέλεσε η ταυτόχρονη στόχευση δυο μορίων σε patient-derived xenografts NSCLC σε ποντίκια. Τα dual CAR T cells είχαν ως στόχο το PSCA και το MUC1 σε PSCA<sup>+</sup> MUC1<sup>+</sup> NSCLC. Παρατηρήθηκε ικανοποιητική μείωση των όγκων, αλλά δεν υπήρξε ολοκληρωτική εξάλειψη του NSCLC στα xenografts. Οι συγγραφείς εικάζουν ότι γι' αυτό ευθύνεται η μειωμένη επιβίωση των CAR T cells στο ιδιαίτερα ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον των NSCLC όγκων (Wei et al., 2017).

Το ROR1 εκφράζεται και στον triple-negative breast cancer (TNBC) and NSCLC. Μια έρευνα επικεντρώθηκε στο ROR1 μόριο σε organoids από TNBC και NSCLC κυτταρικές γραμμές. ROR1-specific CAR T θεραπεία δοκιμάστηκε στα organoids με πολύ καλά αποτελέσματα, καθώς τα CAR T cells διείσδυσαν βαθιά στο εσωτερικό του όγκου και παρατηρήθηκε εξάλειψη αρκετών περιοχών του (Wallstabe et al., 2019).

Ο καρκίνος του πνεύμονα χαρακτηρίζεται από τις ισχυρές ανοσοκατασταλτικές του ιδιότητες με αποτέλεσμα τον μικρό αριθμό εισόδου κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων. Το B7 Homolog 3 (B7-H3), ή αλλιώς CD276, ανήκει στην B7 οικογένεια και αποτελεί immune checkpoint μόριο που παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον στην ανοσοθεραπεία. Το B7-H3 υπερεκφράζεται σε ένα μεγάλο εύρος καρκινικών κυττάρων, όπως σε όγκους του πνεύμονα και καρκίνο του μαστού. Η χαμηλή του έκφραση σε φυσιολογικούς ιστούς, το καθιστά πιθανό στόχο των CAR T cells και οι ανοσοκατασταλτικές του ιδιότητες, στόχο των checkpoint inhibitors (W. T. Zhou & Jin, 2021). Μέσα από έρευνες φαίνεται ότι τα B7-H3 μόρια σχετίζονται άμεσα με τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, την μετάσταση και την πρόγνωση σε NSCLC όγκους. Φαίνεται να υπάρχει θετική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του B7-H3, στα καρκινικά κύτταρα και του αριθμού των CD8<sup>+</sup> T λεμφοκυττάρων στο TME. Αυτό ίσως οφείλεται στην παραγωγή IFN $\gamma$  από τα T κύτταρα, όπως και στην περίπτωση του PD-L1. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αυξήσουν την έκφραση του PD-L1 ως απόκριση στις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες των T λεμφοκυττάρων και να αναστείλουν τις αντικαρκινικές τους δράσεις. Οπότε η συνδυαστική προσέγγιση μέσα από immune checkpoint blockade και CAR T cells, μοιάζει ως πιο πιθανή λύση (Amorì et al., 2021; Webb et al., 2018).

Κλινικές μελέτες CAR T θεραπείας για καρκίνο του πνεύμονα: NCT05341492 (EGFR/B7H3), NCT02706392 (ROR1),

### **Καρκίνος του μαστού**

Σύμφωνα με το CDC ο καρκίνος του μαστού, αποτελεί την δεύτερη κύρια αιτία θανάτου του γυναικείου πληθυσμού από καρκίνο. Η παθογένεση του καρκίνου του μαστού, ξεκινά με τον ενεργό πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων του

μαστού, οδηγώντας στην ανάπτυξη κακοήθους καρκίνου είτε στα λόβια είτε στους πόρους του μαστού. Ο κλασικός στόχος των CAR T cells για τον καρκίνο του μαστού, αποτελεί το HER2 έχοντας φέρει αρκετά ενθαρρυντικά αποτελέσματα. 3<sup>ης</sup> γενιάς anti-HER2 CAR T cells παρουσίασαν αυξημένες λειτουργίες in vitro και σε μοντέλα ποντικών, με HER2<sup>+</sup> καρκίνο του μαστού, σε συνεργασία με checkpoint inhibitors (P. Li et al., 2020). Άλλοι στόχοι όπως ROR1, EGFR, cMet, MSLN αξιολογούνται (Y. H. Yang, Liu, Lu, & Wei, 2022).

Ο triple-negative breast cancer (TNBC) αποτελεί ένα αρκετά επιθετικό υπότυπο καρκίνου του μαστού με το χαρακτηριστικό του γνώρισμα να είναι η έλλειψη έκφρασης υποδοχέων οιστρογόνου, προγεστερόνης και έλλειψη HER2. Οπότε, οι κλασικές προσεγγίσεις με anti-HER2 T cells, δεν αποτελούν λύση κατά την ανοσοθεραπεία. Για τον λόγο για την CAR T θεραπεία πρέπει να διερευνηθούν άλλα TAAs (Dees, Ganesan, Singh, & Grewal, 2020). Πιθανός στόχος των CAR T cells για τον TNBC, αποτελεί ο EGFR με περίπου το 45% έως 70% των ασθενών με TNBC να παρουσιάζουν υπερέκφραση. Σε μια έρευνα η στόχευση του EGFR με CAR T cells με CD28 TMD και 4-1BB.CD3ζ σηματοδότηση παρουσίασε θετικά αποτελέσματα in vitro, αλλά και ανέστειλαν την αύξηση του όγκου σε xenograft μοντέλα ποντικών (Y. Liu et al., 2019).

Ιστοχημικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι η μεσοθηλίνη υπερεκφράζεται περίπου στο 67% των TNBC δειγμάτων. Το MSLN μόριο κυτταρικής προσκόλλησης που εκφράζεται στο μεσοθήλιο, έχει δείξει ότι είναι αρκετά ανοσογονικό και δεν εκφράζεται σε μεγάλες ποσότητες στους φυσιολογικούς ιστούς, καθιστώντας το πιθανό TAA. Τα CAR T cells με στόχο την MSLN έχουν παρουσιάσει κυτταρολυτική δράση και παραγωγή κυτοκινών in vitro. PD-1 knockout με CRISPR σε συνδυασμό με anti-MSLN CAR T cells παρουσίασε αυξημένη αντικαρκινική δράση σε TNBC xenograft μοντέλα ποντικών (Hu et al., 2019).

Οι ιντεγκρίνες έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται συχνότερα ως στόχος των CAR T cells, καθώς παίζουν κομβικό ρόλο στην προσκόλληση και επικοινωνία των κυττάρων με την ECM και υπερεκφράζονται σε διάφορα είδη όγκων προωθώντας την ανάπτυξή τους. Η ιντεγκρίνη ανβ3 είναι μια από τις πιο καλομελετημένες στον χώρο της ογκολογίας και αυξημένη έκφραση έχει παρατηρηθεί στον TNBC και στο TME. CAR T cells 2<sup>ης</sup> γενιάς με στόχο την ανβ3 ιντεγκρίνη και EGFRt suicide γονίδιο για τον περιορισμό των τοξικοτήτων, παρουσίασαν ικανή αντικαρκινική δράση και παραγωγή κυτοκινών όπως IL-2 και IFN $\gamma$  (Wallstabe et al., 2018). Άλλοι στόχοι: GD2, ICAM-1, Mucin1 γλυκοπρωτεΐνη, EGFR/B7-H3.

Κλινικές μελέτες CAR T θεραπείας για καρκίνο του μαστού: NCT05341492 (EGFR/B7H3), NCT04025216 (TnMUC1) , NCT04020575 (Autologous huMNC2-CAR44 T) , NCT02792114 (mesothelin), NCT03740256 (HER2-Specific Autologous CAR VST)

## **Γλοίωμα**

Το γλοίωμα είναι ένας ευρύς ορός για να περιγράψει όγκους νευρογλοιακών κυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος, τα υποστηρικτικά μη-νευρικά κύτταρα. Το γλοίωμα αφορά όγκους σε αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα και επενδυτικά

κύτταρα. Από αυτούς τους όγκους, το Glioblastoma multiforme (GBM), πολύμορφο γλοιοβλάστωμα που ανήκει στα αστροκυτώματα, αποτελεί το πιο συχνό και επιθετικό είδος όγκου στον ενήλικο εγκέφαλο, με πάρα πολύ υψηλά ποσοστά θνησιμότητας (Land et al., 2020).

Στόχος που προσελκύει ενδιαφέρον αποτελεί η παραλλαγή epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII), που προκύπτει από in-frame διαγραφή των εξονίων 2-7 του EGFR. Αποτελεί μια συνηθισμένη μετάλλαξη της εξωκυττάριας περιοχής της EGFR με αυξημένη έκφραση στο γλοίωμα και στο 30% των GBM όγκων. Οι αλλαγές στην εξωκυτταρική περιοχή που επιφέρει αυτή η μετάλλαξη, παρέχουν έναν μοναδικό επίτοπο της παραλλαγής του EGFR στα καρκινικά κύτταρα και ραγδαία μείωση του ρίσκου για on-target off-tumor τοξικότητες (J. Yang, Yan, & Liu, 2017). Αυτό φάνηκε και μέσα από την δημιουργία CARs 3<sup>ης</sup> γενιάς, τα οποία αναγνώριζαν επιλεκτικά τα κύτταρα γλοιώματος με EGFRvIII έκφραση, ενώ δεν αναγνώρισαν κύτταρα με φυσιολογική EGFR μορφή in vitro. Τα EGFRvIII-CAR T cells ενώ παρουσίασαν αντικαρκινική ισχύ σε προκλινικά μοντέλα, εμφάνισαν περιορισμένη αποτελεσματικότητα όταν πέρασαν σε κλινικές φάσεις (Goff et al., 2019). Σε 10 ασθενείς με υποτροπιάζον γλοιοβλάστωμα παρατηρήθηκε antigen loss και ανθεκτικότητα του όγκου, μετά από ενδοφλέβια έγχυση EGFRvIII-specific CAR T cells. Με βάση το γεγονός ότι τα microRNAs (miRNAs) αποτελούν κύριους ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων και της ομοιόστασης μια έρευνα επικεντρώθηκε στην έκφραση του miR-17-92 και στο πως επιδρά στην αποτελεσματικότητα των CAR T cells με στόχο το EGFRvIII σε γλοιοβλάστωμα. Η αντικαρκινική δράση των CAR T cells ενισχύθηκε με την συνέκφραση του miR-17-92 κάτι που μπορεί να φανεί χρήσιμο και σε άλλους όγκους (Ohno et al., 2013). Άλλη έρευνα με χορήγηση  $1 \times 10^{10}$  CAR T cells σε EGFRvIII θετικό γλοίωμα, δεν παρουσιάστηκε κάποια ιδιαίτερη τοξικότητα αλλά με δόσεις  $3 \times 10^{10}$  και  $6 \times 10^{10}$  CAR T cells, ο ένας ασθενής παρουσίασε σοβαρές επιπλοκές με δύσπνοια και υποξία, ενώ ο ασθενής με την μεγαλύτερη χορήγηση πέθανε 4 ώρες μετά την έγχυση με σοβαρή δύσπνοια και υπόταση. Μέσα από όλα αυτά, το μέλλον κρίνεται αβέβαιο γι' αυτόν τον στόχο (J. Yang et al., 2017).

Ο υποδοχέας IL-13 (IL13Ra2) εκφράζεται στους περισσότερους GBM παιδιατρικούς όγκους, αλλά και σε ενήλικες, ενώ δεν παρουσιάζει σημαντική έκφραση στους φυσιολογικούς ιστούς του εγκεφάλου (Maggs, Cattaneo, Dal, Moghaddam, & Ferrone, 2021; Zeng et al., 2020). Σε μια αρχική μελέτη, η ενδοκρανιακή χορήγηση  $1 \times 10^8$  IL13Ra2-specific CAR T cells, παρουσίασε ασφάλεια και μικρής διάρκειας αντικαρκινική απόκριση, σε 2/3 άτομα με GBM που έλαβαν την θεραπεία (Brown et al., 2015). Σε άλλη έρευνα γλοιοβλαστώματος με στόχο τον IL13Ra2, χρησιμοποιήθηκαν CAR T cells 4<sup>ης</sup> γενιάς, με συνέκφραση IL-15 και CD28.ζ δομή. Ο συνδυασμός αυτός φάνηκε να προσδίδει αποτελεσματικότητα στην προσέγγιση αυτή, με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα CAR T cells με την συνέκφραση IL-15, σε σχέση με συμβατικά IL13Ra2 CAR T cells. Στα xenografts, τα IL13Ra2-CAR.IL15 T cells είχαν βελτιωμένη αντικαρκινική δράση και μεγαλύτερο persistence. Επανεξέταση ποντικών με υποτροπή, μετά από 20 και 40 ημέρες, έδειξε διαφορά στην ποσότητα έκφρασης IL13Ra2 από τα καρκινικά κύτταρα. Στις 20 ημέρες post-CAR T χορήγησης, η επανεμφάνιση του γλοιώματος ήταν με θετική έκφραση IL13Ra2. Όμως, σε υποτροπές που εξετάστηκαν 40 ημέρες μετά την έγχυση των CAR T cells, πάνω από

το 80% των κυττάρων του όγκου παρουσίασαν αρνητική έκφραση IL13Rα2, δείχνοντας immune escape από αρνητική έκφραση του στόχου (Krenciute et al., 2017).

Το HER2 υπερεκφράζεται στο 80% of GBM όγκων. Οπότε αποτελεί στόχο μελετών για το γλοίωμα. Οι έρευνες έχουν δείξει αποτελεσματική αναγνώριση και εξάλειψη καρκινικών GBM κυττάρων in vitro με HER2-specific CAR T cells 3<sup>ης</sup> γενιάς. Επιπλέον συνιστάται συνδυαστική προσέγγιση με PD-1 blockade για καλύτερα αποτελέσματα της CAR T θεραπείας (L. Shen et al., 2019). Ενδιαφέρον παρουσιάζει μια έρευνα με χρήση Virus-specific T cells για την έκφραση των anti-HER2 CARs. Τα κύτταρα αυτά θα μπορούν να δεχθούν ερεθίσματα μέσω κάποιου ιικού παράγοντα μέσω του TCR και να έχουν αντικαρκινική δράση μέσω των CARs για το GBM. Η χορήγηση  $1 \times 10^8$  HER2-specific CAR VST cells με CD28.ζ σηματοδοτική περιοχή σε 17 ασθενείς με GBM, δεν παρουσίασε τοξικότητες με βάση την δόση. Τα αποτελέσματα ήταν θετικά σε 8/17 ασθενείς που έλαβαν την θεραπεία και τα CAR VST cells παρατηρήθηκαν στο αίμα των ασθενών 1 χρόνο μετά την έγχυση τους (Ahmed et al., 2017). Άλλοι στόχοι: GD2, metalloproteinase 2 (MMP2), CD147, B7-H3.

Κλινικές μελέτες CAR T θεραπείας για γλοίωμα: NCT04185038 (B7-H3), NCT04196413 (GD2), NCT03500991 (HER2), NCT04214392 (MMP2)

### **Καρκίνος παχέος εντέρου**

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (colorectal cancer, CRC) είναι ιδιαίτερα γνωστός για τις μεταστάσεις που προκαλεί, ιδιαίτερα στο ήπαρ, μειώνοντας δραστικά το προσδόκιμο ζωής των ασθενών. Οι μεταστάσεις, σε συνδυασμό με τις υποτροπές, καθιστούν τον CRC στόχο ανοσοθεραπείας. Οι κύριοι στόχοι της CAR T cell θεραπείας για CRC είναι: CEA, EGFR, MUC1, HER2 (H. Li, Yang, Cheng, Huang, & Zheng, 2021).

Ο πιο κοινός καρκινικός δείκτης στο CRC αποτελεί το CEA. Σε κλινική μελέτη Phase I χορηγήθηκε anti-CEA CAR T cell θεραπεία σε 10 ασθενείς με ανθεκτικό ή υποτροπιάζον metastatic CRC (mCRC). Οι ασθενείς αποκρίθηκαν χωρίς τοξικότητες στην θεραπεία, ακόμα και σε υψηλές δόσεις, παρατηρήθηκε σταθεροποίηση της κατάστασής τους και μερικοί έδειξαν υποχώρηση του όγκου (C. Zhang, Wang, et al., 2017). Το HER2 υπερεκφράζεται και στους CRC όγκους με αρκετά αυξημένη έκφραση στις μεταστάσεις του CRC. Anti-HER2 CAR T cells 2<sup>ης</sup> γενιάς παρουσίασαν κυτταρολυτική δράση in vitro και in vivo σε μοντέλα ποντικών. Όμως, ασθενής με mCRC, πέθανε 5 ημέρες μετά από ενδοφλέβια χορήγηση  $1 \times 10^{10}$  CAR T cells 3<sup>ης</sup> γενιάς με στόχο το HER2. Το γεγονός πιστεύεται ότι ήταν on-target off-tumor τοξικότητα στους πνεύμονες καθώς τα CAR T cells συσσωρεύτηκαν μέσα σε λίγη ώρα στους πνεύμονες και επιτέθηκαν σε επιθηλιακά κύτταρα με χαμηλή έκφραση HER2 (R. A. Morgan et al., 2010; J. Xu et al., 2021).

Το GUCY2C (Guanylyl cyclase C) εκφράζεται σχεδόν στο 100% των καρκίνων του παχέος εντέρου και διατηρείται σε υψηλά επίπεδα έκφρασης σε μεταστάσεις. Αποτελεί μια κυκλάση της μεμβράνης και σε φυσιολογικά επίπεδα η έκφρασή του παρατηρείται μόνο στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, γι' αυτό και αποτέλεσε από νωρίς έναν αρκετά προσιτό στόχο ανοσοθεραπείας για τον καρκίνο παχέος εντέρου. Σε μια έρευνα, τα

CAR T cells φάνηκαν να είναι αποτελεσματικά και ασφαλή σε ανθρώπινα xenografts και σε μοντέλα ποντικών με μεταστάσεις στους πνεύμονες παρουσίασαν μακροπρόθεσμα αποτελέσματα (Magee et al., 2018).

Συνδυαστική προσέγγιση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσα από immune checkpoint inhibitors. Οι θεραπείες Pembrolizumab και nivolumab αποτελούν τα checkpoint inhibitors που έχουν παρουσιάσει τα καλύτερα αποτελέσματα και έχουν εγκριθεί για περιπτώσεις με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου (Cancanelli et al., 2021). Μια τέτοια προσέγγιση με ενδιαφέρον αποτελεί η χρήση anti-MSLN CAR T cells με έκκριση PD-1 nanobodies για το μπλοκάρισμα της ανοσοκαταστολής. Η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα τέτοιων αυτόλογων αPD1-MSLN-CAR T cells αξιολογείται (NCT05089266).

Κλινικές μελέτες CAR T θεραπείας για καρκίνο παχέος εντέρου: NCT04513431 και NCT05240950 (CEA)

### **Νευροβλάστωμα**

Το νευροβλάστωμα είναι ένα είδος καρκίνου που εμφανίζεται σε προγονικά νευρικά κύτταρα, που ονομάζονται νευροβλάστες, στο συμπαθητικό νευρικό σύστημα ατόμων μικρής ηλικίας. Αποτελεί τον πιο συχνό εξωκρανιακό στερεό όγκο της παιδικής ηλικίας, με μέσο ηλικιακό όρο διάγνωσης πολύ κάτω των 10 ετών. Καταλαβαίνει λοιπόν κάνεις, την σημασία της αντιμετώπισης των όγκων αυτών. Διάφοροι στόχοι εξετάστηκαν σε προκλινικά μοντέλα αλλά μόνο μελέτες με κύριο στόχο το GD2 (Richards et al., 2018).

Το GD2 αποτέλεσε προφανή στόχο της CAR T θεραπείας, καθώς οι θεραπείες μονοκλωνικών αντισωμάτων με στόχο το GD2, ήταν αποτελεσματικές. Το GD2 υπερεκφράζεται και παρουσιάζει ομοιογένεια έκφρασης στους ιστούς του νευροβλαστώματος. CAR T cells 3<sup>ης</sup> γενιάς με CD28 και OX40 σηματοδότηση χρησιμοποιήθηκαν εναντίον του GD2 σε 11 ασθενείς με ανθεκτικό ή υποτροπιάζον νευροβλάστωμα. Η χορήγηση των anti-GD2 CAR T cells πραγματοποιήθηκε σε ομάδες ασθενών. Η πρώτη ομάδα έλαβε μόνο τα CAR T cells, η δεύτερη ομάδα έλαβε και χημειοθεραπεία πριν την χορήγηση των CAR T cells, ενώ η τρίτη ομάδα χημειοθεραπεία, CAR T cells και checkpoint αναστολείς του PD-1 θεραπεία pembrolizumab. Οι ομάδες 2 και 3 παρουσίασαν αρκετά μεγαλύτερη ανάπτυξη των CAR T cells, σε σχέση με τους ασθενείς που δεν έλαβαν χημειοθεραπεία. Οι checkpoint αναστολείς, δεν φαίνεται να προσέδωσαν κάποιο πλεονέκτημα στην 3<sup>η</sup> ομάδα. Γενικά όμως η προσπάθεια φάνηκε αναποτελεσματική με μικρή αντικαρκινική ισχύ, λόγω αυξημένου exhaustion από το τονικό σήμα μέσα από την δημιουργία συσσωματωμάτων των 14G2a scFvs στην κυτταρική επιφάνεια των CAR T cells (Heczey et al., 2017).

4<sup>ης</sup> γενιάς anti-GD2 CAR T cells με CD28 και CD27 σηματοδοτική περιοχή συμπεριλαμβανομένων και των CD3ζ αλυσίδων, σχεδιάστηκαν για την αντιμετώπιση stage IV νευροβλαστώματος σε 34 ασθενείς υψηλού κίνδυνου. Η ex vivo μεταφορά του διαγονιδίου πραγματοποιήθηκε με ιικό φορέα και περιείχε και iCas9 suicide gene ως μέσο ασφαλείας. Οι ασθενείς έλαβαν παράγοντα χημειοθεραπείας πριν την χορήγηση 1.1x10<sup>6</sup> CAR T cells/kg κατά μέσο όρο. Grade 1 CRS εμφανίστηκε στο 50%

των ασθενών και grade 2 CRS στο 26%. Το 24% δεν εμφάνισε καθόλου ανεπιθύμητες παρενέργειες και δεν υπήρξαν περιπτώσεις με grade 3 και grade 4 τοξικότητα. Τα CAR T cells παρουσίασαν ανθεκτικότητα ακόμα και 180 ημέρες μετά την έγχυση, με 2 άτομα να παρουσιάζουν αισθητή μείωση των όγκων ακόμα και κατά 99.5% σε έναν ασθενή την 28<sup>η</sup> ημέρα. Ένα έτος μετά την έγχυση της θεραπείας παρουσιάστηκαν τα εξής δεδομένα: 15% partial responses, 35% steady disease και 1-year overall survival rate: 74% (X. Xu et al., 2020). Ενδιαφέρον παρουσιάζει και μια άλλη κλινική μελέτη με 4<sup>ης</sup> γενιάς GD2 CAR T cells, έκφραση IL-15 και iCas9 suicide γονίδιο σε νευροβλαστώματα, μια δομή που την ονομάζουν iC9.GD2.CAR.IL-15 T cells (NCT03721068). Σε άλλη έρευνα, τροποποιημένα με point mutations για την συγγένεια, high affinity CAR T cells με στόχο το GD2 είχαν θανατηφόρα αποτελέσματα, λόγω εγκεφαλίτιδας σε προκλινικά μοντέλα νευροβλαστώματος, μαρτυρώντας την ανάγκη ύπαρξης ισορροπίας ανάμεσα σε αναγνώριση και αντικαρκινική ισχύ. Η αύξηση της συγγένειας, βελτίωσε τα αντικαρκινικά αποτελέσματα in vitro και in vivo, αλλά με σοβαρή περίπτωση on target off-tumor νευροτοξικότητας του κεντρικού νευρικού συστήματος, που σχετίστηκε με αυξημένη είσοδο T κυττάρων σε περιοχές του εγκεφάλου με GD2<sup>+</sup> έκφραση (Richman et al., 2018). Άλλοι στόχοι: L1 cell adhesion molecule (L1-CAM), B7-H3 (Richards et al., 2018).

Κλινικές μελέτες CAR T θεραπείας για νευροβλάστωμα: NCT04539366 (GD2), NCT04864821 (B7-H3).

### **Καρκίνος του προστάτη**

Βασικοί στόχοι CAR T θεραπείας για τον καρκίνο του προστάτη αποτελούν: PSMA και PSCA. In vitro και in vivo μοντέλα έχουν δείξει ότι τα anti-PSMA CAR T cells πολλαπλασιάζονται και αναγνωρίζουν τα PSMA<sup>+</sup> κύτταρα. Όμως, ο καρκίνος του προστάτη χαρακτηρίζεται από ένα αρκετά ανοσοκατασταλτικό μικροπεριβάλλον λόγω της υψηλής παρουσίας του TGFβ (Yu, Pan, Guo, Yang, & Mao, 2019). Γι' αυτόν τον λόγο δημιουργήθηκαν anti-PSMA CAR T cells με έκφραση dominant negative TGFβ, με σκοπό την αναστολή του TGFβ και την ενίσχυση της αντικαρκινικής απόκρισης. Τα CAR T cells χορηγήθηκαν σε 4 επίπεδα δόσεων, σε 13 ασθενείς και 5 από αυτούς παρουσίασαν grade  $\geq 2$  CRS με αυξημένα επίπεδα IL-2, IL-6, IL-15, IFN $\gamma$ . Κατά την αξιολόγηση των δειγμάτων μετά την χορήγηση της θεραπείας, παρατηρήθηκε εξαρτώμενη από την δόση ανάπτυξη των CAR T cells και είσοδος T λεμφοκυττάρων στον καρκινικό ιστό. Στα prostate-specific antigen (PSA) επίπεδα παρατηρήθηκε μείωση, δείχνοντας έτσι αντικαρκινική ισχύ. Ένας ασθενής παρουσίασε υπερβολική ανάπτυξη των CAR T cells, >98% μείωση PSA (PSA<0.1 ng/mL αίματος) και θάνατο με grade 4 CRS από σήψη (Narayan et al., 2022). Άλλη κλινική μελέτη Phase I με anti-PSMA CAR και PD-1 knockout με CRISPR/Cas9 αξιολογείται για την ασφάλεια και αποτελεσματικότητα της σε 18 άτομα με καρκίνο του προστάτη (NCT04768608).

Άλλος στόχος για τον καρκίνο του προστάτη αποτελεί το PSCA. Στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη, το ποσοστό έκφρασης του PSCA είναι σχεδόν 90% και πολύ υψηλότερο απ' ό,τι στον φυσιολογικό ιστό. Κατά την εξέλιξη του όγκου, το ποσοστό έκφρασης στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να αγγίξει και το 100%, κάνοντας το PSCA κατάλληλο TAA της CAR T cell θεραπείας (Abate-Daga et al., 2014). Κλινική μελέτη

έδειξε μείωση των PSA επιπέδων σε ασθενείς που έλαβαν anti-PSCA CAR T cell δόσεις, αλλά η ασθένεια παρέμεινε σταθερή. Δεν εμφανίστηκαν CRS > grade 2 και η δόση σε επόμενο χρόνο αναμένεται να αυξηθεί (NCT03873805).

### **Καρκίνος του θυρεοειδούς**

Το μόριο κυτταρικής προσκόλλησης ICAM-1 παρουσιάζει αυξημένη έκφραση σε αρκετά καρκινώματα, στο στρώμα του όγκου και σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, αποτελώντας έτσι έναν καλό στόχο για την CAR T cell θεραπεία. Low affinity LFA-1 I domain-based CAR T cells με στόχο το ICAM-1, παρουσίασαν καλύτερη αποτελεσματικότητα και μεγαλύτερη ασφάλεια χωρίς τοξικότητες σε ασθενείς, συγκριτικά με higher affinity αντίστοιχους CARs. Τα high affinity CAR T cells παρουσίασαν τοξικότητες, λόγω αυξημένων επιπέδων κυτοκινών μετά την ενεργοποίησή τους. Η έκφραση όμως του ICAM-1 και από φυσιολογικά κύτταρα μπορεί να θέσει πρόβλημα στο θέμα της ασφαλείας, καθώς οι τοπικές συγκεντρώσεις προφλεγμονωδών κυτοκινών μπορεί να είναι υψηλές, προκαλώντας τοξικότητες (S. Park et al., 2017). Σε άλλη έρευνα με στόχο πάλι το ICAM-1 που παρουσιάζει αυξημένη έκφραση και σε καρκινώματα του θυρεοειδούς, η υπερέκφραση του σχετίστηκε με πολύ επιθετικό τύπο καρκινικών κυττάρων του θυρεοειδούς. Τα ICAM-1 CAR T cells παρουσίασαν αναγνώριση, κυτταρόλυση και εξάλειψη των κυττάρων με αρκετά αυξημένη ICAM-1 έκφραση, ενώ δεν επιτέθηκαν στα κύτταρα με χαμηλότερη έκφραση. Επιπλέον παρουσιάστηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στην παραγωγή IFN $\gamma$  από τα CAR T cells και στην έκφραση ICAM-1 από τα καρκινικά κύτταρα, κάτι που μπορεί να θέσει εμπόδια στην ασφάλεια καθώς η αύξηση έκφρασης ICAM-1 και από τα φυσιολογικά κύτταρα θα μπορούσε να προκαλέσει on-target off-tumor τοξικότητες. Γι' αυτό η τροποποίησή της συγγένειας φαίνεται και εδώ να είναι σημαντική καθώς ο στόχος εκφράζεται και στα φυσιολογικά κύτταρα (Min et al., 2017).

Η αρκετά ομοιογενής υπερέκφραση του thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) κατά 90% στο θηλώδες καρκίνωμα και 89% στο θυλακιώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς αδένα το καθιστά πιθανό TAA στόχο για differentiated thyroid cancer (DTC). Τρεις διαφορετικοί anti-TSHR CARs δημιουργήθηκαν με εξωκυτταρική περιοχή αναγνώρισης, από διαφορετικά αντισώματα, και τα CAR T cells παρουσίασαν καλή αποτελεσματικότητα in vitro, αλλά μόνο ένα είχε αντικαρκινική ισχύ in vivo σε DTC μοντέλα. Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι η anti-TSHR CAR T θεραπεία παρουσιάζει θεραπευτικό ενδιαφέρον σε ασθενείς με τοπική υποτροπή ή μετάσταση καρκίνου του θυρεοειδούς σε μακρινό ιστό (H. Li et al., 2022; T. Liu et al., 2017).

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Η CAR T θεραπεία αποτελεί μια από τις πολλά υποσχόμενες μορφές της σύγχρονης ανοσοθεραπείας. Η δομή και τα επίπεδα έκφρασης του χιμαιρικού αντιγονικού υποδοχέα στα τροποποιημένα T λεμφοκύτταρα διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Χαμηλή συγγένεια (low affinity) ως προς το μόριο στόχο φαίνεται να παρέχει στα CAR T κύτταρα εξειδικευμένη αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων και λιγότερες on-target off-tumor τοξικότητες. Υψηλή συγγένεια (high affinity) σχετίζεται με πιο γενικευμένη και έντονη αντικαρκινική δράση αλλά



περισσότερες on-target off-tumor τοξικότητες. Ισχυρότερη συγγένεια πέρα από ένα συγκεκριμένο όριο δεν προωθεί αυξημένη ενεργοποίηση ή ενίσχυση της αντικαρκινικής δράσης των CAR T cells. Οπότε φαίνεται η ανάγκη ύπαρξης μιας ισορροπίας ανάμεσα σε κυτταρική αναγνώριση και κυτταρολυτική δράση των CAR T cells, για την βελτίωση της αποτελεσματικότητας και μια πιο ασφαλή προσέγγιση στο θέμα. Η έκφραση του χμιαϊρικού αντιγονικού υποδοχέα αποτελεί προϊόν ex vivo γονιδιακής μεταφοράς μέσω ποικίλων συστημάτων φορέων του διαγονιδίου. Οι ιικοί φορείς από ρετροϊούς και φακοϊούς (retroviral vectors και lentiviral vectors αντίστοιχα) επιφέρουν την πιο αποτελεσματική και μακροχρόνια έκφραση του CAR υποδοχέα στην κυτταρική επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων. Συστήματα τρανσποζονίων όπως το Sleeping Beauty και το piggyBac να μεν παρέχουν μεγαλύτερη ασφάλεια, αλλά είναι αναποτελεσματικά σε σχέση με τους ιικούς φορείς, οι οποίοι όμως σχετίζονται με γονοτοξικότητες. Οι τοξικότητες που ακολουθούν την CAR T θεραπεία μπορεί να είναι σοβαρές για την κατάσταση του ασθενή. Το σύνδρομο απελευθέρωσης κυτοκινών (CRS) και οι νευρολογικές τοξικότητες (ICANS) αποτελούν τις πιο συχνές τοξικότητες μετά την έγχυση των CAR T cells. Τεχνικές γονιδιακής επεξεργασίας και “συστήματα ασφαλείας” όπως τα suicide genes μπορούν να δώσουν λύσεις στο πρόβλημα αυτό. Η CAR T cell θεραπεία έχει παρουσιάσει εξαιρετικά αποτελέσματα σε αιματολογικές κακοήθειες (λευχαιμίες, λεμφώματα και πολλαπλό μυέλωμα) με αποτέλεσμα την έγκριση θεραπειών με στόχο το CD19 και το BCMA για κακοήθειες B κυττάρων, με υψηλά ποσοστά εξάλειψης των όγκων. Μια αρκετά μεγάλη μερίδα ατόμων όμως, θα παρουσιάσουν υποτροπές με θετική ή αρνητική έκφραση του μορίου στόχου ως μια προσπάθεια προσαρμογής του καρκινικού όγκου στην θεραπεία μέσω αντιγονικής διαφυγής (antigen escape). Dual targeting CAR T cells και συνδυαστικές προσεγγίσεις μέσω θεραπείας με immune checkpoint inhibitors έχουν δείξει ότι μπορούν να περιορίσουν τις υποτροπές και να διατηρήσουν την αποτελεσματικότητα της CAR T θεραπείας. Η μεταφορά της CAR T θεραπείας στην καταπολέμηση στερεών όγκων παραμένει ακόμα ένα δύσκολο εγχείρημα. Μεμονωμένες επιτυχείς προσπάθειες έχουν παρατηρηθεί, παρέχοντας ενθαρρυντικά αποτελέσματα για το μέλλον. Φαίνεται πως ο τρόπος χορήγησης της θεραπείας αποτελεί πρωταρχικό παράγοντα της αποτελεσματικότητας και του περιορισμού των on-target off-tumor τοξικοτήτων. Τα φυσικά εμπόδια των στερεών όγκων και η ετερογένεια έκφρασης κατάλληλων μορίων στόχων της επιφάνειά τους αποτελούν τα πρώτα εμπόδια στην είσοδο των CAR T cells στον όγκο. Το μικροπεριβάλλον του όγκου (TME) βέβαια, ίσως αποτελεί την μεγαλύτερη πρόκληση στην αποτελεσματικότητα της CAR T θεραπείας, λόγω των ιδιαίτερων ανοσοκατασταλτικών ιδιοτήτων των κυτταρικών και μη κυτταρικών συστατικών που το απαρτίζουν, περιορίζοντας με τον τρόπο αυτό την αντικαρκινική δράση των CAR T cells.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Abate-Daga, D., Lagisetty, K. H., Tran, E., Zheng, Z., Gattinoni, L., Yu, Z., . . . Morgan, R. A. (2014). A novel chimeric antigen receptor against prostate stem cell antigen mediates

- tumor destruction in a humanized mouse model of pancreatic cancer. *Hum Gene Ther*, 25(12), 1003-1012. doi:10.1089/hum.2013.209
- Ager, A. (2017). High Endothelial Venules and Other Blood Vessels: Critical Regulators of Lymphoid Organ Development and Function. *Front Immunol*, 8, 45. doi:10.3389/fimmu.2017.00045
- Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B., & Hamid, M. (2012). scFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol*, 2012, 980250. doi:10.1155/2012/980250
- Ahmed, N., Brawley, V., Hegde, M., Bielamowicz, K., Kalra, M., Landi, D., . . . Gottschalk, S. (2017). HER2-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified Virus-Specific T Cells for Progressive Glioblastoma: A Phase 1 Dose-Escalation Trial. *JAMA Oncol*, 3(8), 1094-1101. doi:10.1001/jamaoncol.2017.0184
- Ajina, A., & Maher, J. (2018). Strategies to Address Chimeric Antigen Receptor Tonic Signaling. *Mol Cancer Ther*, 17(9), 1795-1815. doi:10.1158/1535-7163.mct-17-1097
- Alizadeh, D., Wong, R. A., Yang, X., Wang, D., Pecoraro, J. R., Kuo, C. F., . . . Brown, C. E. (2019). IL15 Enhances CAR-T Cell Antitumor Activity by Reducing mTORC1 Activity and Preserving Their Stem Cell Memory Phenotype. *Cancer Immunol Res*, 7(5), 759-772. doi:10.1158/2326-6066.cir-18-0466
- Alsaab, H. O., Sau, S., Alzhrani, R., Tatiparti, K., Bhise, K., Kashaw, S. K., & Iyer, A. K. (2017). PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol*, 8, 561. doi:10.3389/fphar.2017.00561
- Amini, L., Silbert, S. K., Maude, S. L., Nastoupil, L. J., Ramos, C. A., Brentjens, R. J., . . . Abou-El-Enin, M. (2022). Preparing for CAR T cell therapy: patient selection, bridging therapies and lymphodepletion. *Nat Rev Clin Oncol*, 19(5), 342-355. doi:10.1038/s41571-022-00607-3
- Amori, G., Sugawara, E., Shigematsu, Y., Akiya, M., Kunieda, J., Yuasa, T., . . . Inamura, K. (2021). Tumor B7-H3 expression in diagnostic biopsy specimens and survival in patients with metastatic prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 24(3), 767-774. doi:10.1038/s41391-021-00331-6
- Anderson, N. M., & Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Curr Biol*, 30(16), R921-R925. doi:10.1016/j.cub.2020.06.081
- Arcangeli, S., Rotiroti, M. C., Bardelli, M., Simonelli, L., Magnani, C. F., Biondi, A., . . . Varani, L. (2017). Balance of Anti-CD123 Chimeric Antigen Receptor Binding Affinity and Density for the Targeting of Acute Myeloid Leukemia. *Mol Ther*, 25(8), 1933-1945. doi:10.1016/j.ymthe.2017.04.017
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245-252. doi:10.1038/32588
- Barclay, A. N. (1999). Ig-like domains: evolution from simple interaction molecules to sophisticated antigen recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(26), 14672-14674. doi:10.1073/pnas.96.26.14672
- Barrett, D. M., Liu, X., Jiang, S., June, C. H., Grupp, S. A., & Zhao, Y. (2013). Regimen-specific effects of RNA-modified chimeric antigen receptor T cells in mice with advanced leukemia. *Hum Gene Ther*, 24(8), 717-727. doi:10.1089/hum.2013.075
- Barrett, D. M., Zhao, Y., Liu, X., Jiang, S., Carpenito, C., Kalos, M., . . . Grupp, S. A. (2011). Treatment of advanced leukemia in mice with mRNA engineered T cells. *Hum Gene Ther*, 22(12), 1575-1586. doi:10.1089/hum.2011.070
- Barry, A. E., Baldeosingh, R., Lamm, R., Patel, K., Zhang, K., Dominguez, D. A., . . . Dang, H. (2020). Hepatic Stellate Cells and Hepatocarcinogenesis. *Front Cell Dev Biol*, 8, 709. doi:10.3389/fcell.2020.00709

- Bell, M., & Gottschalk, S. (2021). Engineered Cytokine Signaling to Improve CAR T Cell Effector Function. *Front Immunol*, *12*, 684642. doi:10.3389/fimmu.2021.684642
- Bemani, P., Mohammadi, M., & Hakakian, A. (2018). ScFv Improvement Approaches. *Protein Pept Lett*, *25*(3), 222-229. doi:10.2174/0929866525666171129225436
- Benjamin, R., Graham, C., Yallop, D., Jozwik, A., Mirci-Danicar, O. C., Lucchini, G., . . . Qasim, W. (2020). Genome-edited, donor-derived allogeneic anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells in paediatric and adult B-cell acute lymphoblastic leukaemia: results of two phase 1 studies. *Lancet*, *396*(10266), 1885-1894. doi:10.1016/s0140-6736(20)32334-5
- Benmebarek, M. R., Karches, C. H., Cadilha, B. L., Lesch, S., Endres, S., & Kobold, S. (2019). Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. *Int J Mol Sci*, *20*(6). doi:10.3390/ijms20061283
- Bettini, M. L., Chou, P. C., Guy, C. S., Lee, T., Vignali, K. M., & Vignali, D. A. A. (2017). Cutting Edge: CD3 ITAM Diversity Is Required for Optimal TCR Signaling and Thymocyte Development. *J Immunol*, *199*(5), 1555-1560. doi:10.4049/jimmunol.1700069
- Bever, C. S., Dong, J. X., Vasylieva, N., Barnych, B., Cui, Y., Xu, Z. L., . . . Gee, S. J. (2016). VHH antibodies: emerging reagents for the analysis of environmental chemicals. *Anal Bioanal Chem*, *408*(22), 5985-6002. doi:10.1007/s00216-016-9585-x
- Bielamowicz, K., Fousek, K., Byrd, T. T., Samaha, H., Mukherjee, M., Aware, N., . . . Ahmed, N. (2018). Trivalent CAR T cells overcome interpatient antigenic variability in glioblastoma. *Neuro Oncol*, *20*(4), 506-518. doi:10.1093/neuonc/nox182
- Bishop, D. C., Clancy, L. E., Simms, R., Burgess, J., Mathew, G., Moezzi, L., . . . Micklethwaite, K. P. (2021). Development of CAR T-cell lymphoma in 2 of 10 patients effectively treated with piggyBac-modified CD19 CAR T cells. *Blood*, *138*(16), 1504-1509. doi:10.1182/blood.2021010813
- Biswas, S. K., Allavena, P., & Mantovani, A. (2013). Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin Immunopathol*, *35*(5), 585-600. doi:10.1007/s00281-013-0367-7
- Bohne, F., Chmielewski, M., Ebert, G., Wiegmann, K., Kürschner, T., Schulze, A., . . . Protzer, U. (2008). T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. *Gastroenterology*, *134*(1), 239-247. doi:10.1053/j.gastro.2007.11.002
- Brassart-Pasco, S., Brézillon, S., Brassart, B., Ramont, L., Oudart, J. B., & Monboisse, J. C. (2020). Tumor Microenvironment: Extracellular Matrix Alterations Influence Tumor Progression. *Front Oncol*, *10*, 397. doi:10.3389/fonc.2020.00397
- Bräunlein, E., & Krackhardt, A. M. (2017). Identification and Characterization of Neoantigens As Well As Respective Immune Responses in Cancer Patients. *Front Immunol*, *8*, 1702. doi:10.3389/fimmu.2017.01702
- Bridgeman, J. S., Hawkins, R. E., Bagley, S., Blaylock, M., Holland, M., & Gilham, D. E. (2010). The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3zeta transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex. *J Immunol*, *184*(12), 6938-6949. doi:10.4049/jimmunol.0901766
- Brown, C. E., Badie, B., Barish, M. E., Weng, L., Ostberg, J. R., Chang, W. C., . . . Jensen, M. C. (2015). Bioactivity and Safety of IL13R $\alpha$ 2-Redirected Chimeric Antigen Receptor CD8+ T Cells in Patients with Recurrent Glioblastoma. *Clin Cancer Res*, *21*(18), 4062-4072. doi:10.1158/1078-0432.ccr-15-0428
- Brudno, J. N., & Kochenderfer, J. N. (2019). Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Rev*, *34*, 45-55. doi:10.1016/j.blre.2018.11.002

- Buchbinder, E. I., & Desai, A. (2016). CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*, *39*(1), 98-106. doi:10.1097/coc.0000000000000239
- Budde, L. E., Berger, C., Lin, Y., Wang, J., Lin, X., Frayo, S. E., . . . Press, O. W. (2013). Combining a CD20 chimeric antigen receptor and an inducible caspase 9 suicide switch to improve the efficacy and safety of T cell adoptive immunotherapy for lymphoma. *PLoS One*, *8*(12), e82742. doi:10.1371/journal.pone.0082742
- Bunse, M., Bendle, G. M., Linnemann, C., Bies, L., Schulz, S., Schumacher, T. N., & Uckert, W. (2014). RNAi-mediated TCR knockdown prevents autoimmunity in mice caused by mixed TCR dimers following TCR gene transfer. *Mol Ther*, *22*(11), 1983-1991. doi:10.1038/mt.2014.142
- Burga, R. A., Thorn, M., Point, G. R., Guha, P., Nguyen, C. T., Licata, L. A., . . . Katz, S. C. (2015). Liver myeloid-derived suppressor cells expand in response to liver metastases in mice and inhibit the anti-tumor efficacy of anti-CEA CAR-T. *Cancer Immunol Immunother*, *64*(7), 817-829. doi:10.1007/s00262-015-1692-6
- Cai, J., Wang, D., Zhang, G., & Guo, X. (2019). The Role Of PD-1/PD-L1 Axis In Treg Development And Function: Implications For Cancer Immunotherapy. *Onco Targets Ther*, *12*, 8437-8445. doi:10.2147/ott.s221340
- Calderon, H., Mamonkin, M., & Guedan, S. (2020). Analysis of CAR-Mediated Tonic Signaling. *Methods Mol Biol*, *2086*, 223-236. doi:10.1007/978-1-0716-0146-4\_17
- Calon, A., Tauriello, D. V., & Batlle, E. (2014). TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis. *Semin Cancer Biol*, *25*, 15-22. doi:10.1016/j.semcancer.2013.12.008
- Campillo-Davo, D., Flumens, D., & Lion, E. (2020). The Quest for the Best: How TCR Affinity, Avidity, and Functional Avidity Affect TCR-Engineered T-Cell Antitumor Responses. *Cells*, *9*(7). doi:10.3390/cells9071720
- Cancanelli, L., Rivano, M., Di Spazio, L., Chiumente, M., Mengato, D., & Messori, A. (2021). Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Patients with Mismatch Repair-Deficient or Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer: Analysis of Three Phase-II Trials. *Cureus*, *13*(11), e19893. doi:10.7759/cureus.19893
- Cao, J., Wang, G., Cheng, H., Wei, C., Qi, K., Sang, W., . . . Xu, K. (2018). Potent anti-leukemia activities of humanized CD19-targeted Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells in patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol*, *93*(7), 851-858. doi:10.1002/ajh.25108
- Capsomidis, A., Benthall, G., Van Acker, H. H., Fisher, J., Kramer, A. M., Abeln, Z., . . . Anderson, J. (2018). Chimeric Antigen Receptor-Engineered Human Gamma Delta T Cells: Enhanced Cytotoxicity with Retention of Cross Presentation. *Mol Ther*, *26*(2), 354-365. doi:10.1016/j.ymthe.2017.12.001
- Caruana, I., Savoldo, B., Hoyos, V., Weber, G., Liu, H., Kim, E. S., . . . Dotti, G. (2015). Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirected T lymphocytes. *Nat Med*, *21*(5), 524-529. doi:10.1038/nm.3833
- Caruso, H. G., Heimberger, A. B., & Cooper, L. J. N. (2019). Steering CAR T cells to distinguish friend from foe. *Oncoimmunology*, *8*(10), e1271857. doi:10.1080/2162402x.2016.1271857
- Castellarin, M., Sands, C., Da, T., Scholler, J., Graham, K., Buza, E., . . . June, C. H. (2020). A rational mouse model to detect on-target, off-tumor CAR T cell toxicity. *JCI Insight*, *5*(14). doi:10.1172/jci.insight.136012
- Chen, Y., Li, R., Shang, S., Yang, X., Li, L., Wang, W., & Wang, Y. (2021). Therapeutic Potential of TNF $\alpha$  and IL1 $\beta$  Blockade for CRS/ICANS in CAR-T Therapy via Ameliorating Endothelial Activation. *Front Immunol*, *12*, 623610. doi:10.3389/fimmu.2021.623610
- Chinnasamy, D., Yu, Z., Kerkar, S. P., Zhang, L., Morgan, R. A., Restifo, N. P., & Rosenberg, S. A. (2012). Local delivery of interleukin-12 using T cells targeting VEGF receptor-2

- eradicates multiple vascularized tumors in mice. *Clin Cancer Res*, 18(6), 1672-1683. doi:10.1158/1078-0432.ccr-11-3050
- Chmielewski, M., & Abken, H. (2015). TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther*, 15(8), 1145-1154. doi:10.1517/14712598.2015.1046430
- Chmielewski, M., & Abken, H. (2017). CAR T Cells Releasing IL-18 Convert to T-Bet(high) FoxO1(low) Effectors that Exhibit Augmented Activity against Advanced Solid Tumors. *Cell Rep*, 21(11), 3205-3219. doi:10.1016/j.celrep.2017.11.063
- Chmielewski, M., Hombach, A., Heuser, C., Adams, G. P., & Abken, H. (2004). T cell activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity. *J Immunol*, 173(12), 7647-7653. doi:10.4049/jimmunol.173.12.7647
- Clere, N., Renault, S., & Corre, I. (2020). Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Front Cell Dev Biol*, 8, 747. doi:10.3389/fcell.2020.00747
- Cohen, C. J., Gartner, J. J., Horovitz-Fried, M., Shamalov, K., Trebska-McGowan, K., Bliskovsky, V. V., . . . Robbins, P. F. (2015). Isolation of neoantigen-specific T cells from tumor and peripheral lymphocytes. *J Clin Invest*, 125(10), 3981-3991. doi:10.1172/jci82416
- Cooray, S., Howe, S. J., & Thrasher, A. J. (2012). Retrovirus and lentivirus vector design and methods of cell conditioning. *Methods Enzymol*, 507, 29-57. doi:10.1016/b978-0-12-386509-0.00003-x
- Corse, E., Gottschalk, R. A., & Allison, J. P. (2011). Strength of TCR-peptide/MHC interactions and in vivo T cell responses. *J Immunol*, 186(9), 5039-5045. doi:10.4049/jimmunol.1003650
- Costa, F., Dalla Palma, B., & Giuliani, N. (2019). CD38 Expression by Myeloma Cells and Its Role in the Context of Bone Marrow Microenvironment: Modulation by Therapeutic Agents. *Cells*, 8(12). doi:10.3390/cells8121632
- Courtney, A. H., Lo, W. L., & Weiss, A. (2018). TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation. *Trends Biochem Sci*, 43(2), 108-123. doi:10.1016/j.tibs.2017.11.008
- Cruz, C. R., Micklethwaite, K. P., Savoldo, B., Ramos, C. A., Lam, S., Ku, S., . . . Dotti, G. (2013). Infusion of donor-derived CD19-redirected virus-specific T cells for B-cell malignancies relapsed after allogeneic stem cell transplant: a phase 1 study. *Blood*, 122(17), 2965-2973. doi:10.1182/blood-2013-06-506741
- Cui, B., Ghia, E. M., Chen, L., Rassenti, L. Z., DeBoever, C., Widhopf, G. F., 2nd, . . . Kipps, T. J. (2016). High-level ROR1 associates with accelerated disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 128(25), 2931-2940. doi:10.1182/blood-2016-04-712562
- Curran, K. J., Seinstra, B. A., Nikhamin, Y., Yeh, R., Usachenko, Y., van Leeuwen, D. G., . . . Brentjens, R. J. (2015). Enhancing antitumor efficacy of chimeric antigen receptor T cells through constitutive CD40L expression. *Mol Ther*, 23(4), 769-778. doi:10.1038/mt.2015.4
- Curtsinger, J. M., Lins, D. C., & Mescher, M. F. (2003). Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J Exp Med*, 197(9), 1141-1151. doi:10.1084/jem.20021910
- D'Aloia, M. M., Zizzari, I. G., Sacchetti, B., Pierelli, L., & Alimandi, M. (2018). CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors. *Cell Death Dis*, 9(3), 282. doi:10.1038/s41419-018-0278-6
- da Costa, V. R., Araldi, R. P., Vigerelli, H., D'Ámelio, F., Mendes, T. B., Gonzaga, V., . . . Kerkis, I. (2021). Exosomes in the Tumor Microenvironment: From Biology to Clinical Applications. *Cells*, 10(10). doi:10.3390/cells10102617
- Dai, H., Wu, Z., Jia, H., Tong, C., Guo, Y., Ti, D., . . . Han, W. (2020). 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*, 13(1), 30. doi:10.1186/s13045-020-00856-8
- Dai, J., Su, Y., Zhong, S., Cong, L., Liu, B., Yang, J., . . . Jiang, Y. (2020). Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal Transduct Target Ther*, 5(1), 145. doi:10.1038/s41392-020-00261-0
- Davila, M. L., Kloss, C. C., Gunset, G., & Sadelain, M. (2013). CD19 CAR-targeted T cells induce long-term remission and B Cell Aplasia in an immunocompetent mouse model of B cell acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*, 8(4), e61338. doi:10.1371/journal.pone.0061338
- Davila, M. L., Riviere, I., Wang, X., Bartido, S., Park, J., Curran, K., . . . Brentjens, R. (2014). Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*, 6(224), 224ra225. doi:10.1126/scitranslmed.3008226
- De Munter, S., Ingels, J., Goetgeluk, G., Bonte, S., Pille, M., Weening, K., . . . Vandekerckhove, B. (2018). Nanobody Based Dual Specific CARs. *Int J Mol Sci*, 19(2). doi:10.3390/ijms19020403
- Dees, S., Ganesan, R., Singh, S., & Grewal, I. S. (2020). Emerging CAR-T Cell Therapy for the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Cancer Ther*, 19(12), 2409-2421. doi:10.1158/1535-7163.mct-20-0385
- Depil, S., Duchateau, P., Grupp, S. A., Mufti, G., & Poirot, L. (2020). 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 19(3), 185-199. doi:10.1038/s41573-019-0051-2
- Deryugina, E. I., Zajac, E., Juncker-Jensen, A., Kupriyanova, T. A., Welter, L., & Quigley, J. P. (2014). Tissue-infiltrating neutrophils constitute the major in vivo source of angiogenesis-inducing MMP-9 in the tumor microenvironment. *Neoplasia*, 16(10), 771-788. doi:10.1016/j.neo.2014.08.013
- Díaz-Basabe, A., Strati, F., & Facciotti, F. (2020). License to Kill: When iNKT Cells Are Granted the Use of Lethal Cytotoxicity. *Int J Mol Sci*, 21(11). doi:10.3390/ijms211113909
- Dourthe, M. E., Rabian, F., Yakouben, K., Chevillon, F., Cabannes-Hamy, A., Méchinaud, F., . . . Baruchel, A. (2021). Determinants of CD19-positive vs CD19-negative relapse after tisagenlecleucel for B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 35(12), 3383-3393. doi:10.1038/s41375-021-01281-7
- Drent, E., Themeli, M., Poels, R., de Jong-Korlaar, R., Yuan, H., de Bruijn, J., . . . Mutis, T. (2017). A Rational Strategy for Reducing On-Target Off-Tumor Effects of CD38-Chimeric Antigen Receptors by Affinity Optimization. *Mol Ther*, 25(8), 1946-1958. doi:10.1016/j.ymthe.2017.04.024
- Duan, H., Huang, H., & Jing, G. (2019). An Antibody Fab Fragment-based Chimeric Antigen Receptor Could Efficiently Eliminate Human Thyroid Cancer Cells. *J Cancer*, 10(8), 1890-1895. doi:10.7150/jca.30163
- Dudley, M. E., & Rosenberg, S. A. (2007). Adoptive cell transfer therapy. *Semin Oncol*, 34(6), 524-531. doi:10.1053/j.seminoncol.2007.09.002
- Egawa, T. (2021). A Fateful Decision in the Thymus Controlled by the Transcription Factor ThPOK. *J Immunol*, 206(9), 1981-1982. doi:10.4049/jimmunol.2100157
- El Chaer, F., Keng, M., & Ballen, K. K. (2020). MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*, 15(2), 83-89. doi:10.1007/s11899-020-00582-5
- Eshhar, Z., Waks, T., & Gross, G. (2014). The emergence of T-bodies/CAR T cells. *Cancer J*, 20(2), 123-126. doi:10.1097/ppo.0000000000000027
- Fabrizio, V. A., Boelens, J. J., Mauguen, A., Baggott, C., Prabhu, S., Egeler, E., . . . Curran, K. J. (2022). Optimal fludarabine lymphodepletion is associated with improved outcomes after CAR T-cell therapy. *Blood Adv*, 6(7), 1961-1968. doi:10.1182/bloodadvances.2021006418

- Famili, F., Wiekmeijer, A. S., & Staal, F. J. (2017). The development of T cells from stem cells in mice and humans. *Future Sci OA*, 3(3), Fso186. doi:10.4155/fsoa-2016-0095
- Feucht, J., & Sadelain, M. (2020). Function and evolution of the prototypic CD28 $\zeta$  and 4-1BB $\zeta$  chimeric antigen receptors. *Immunooncol Technol*, 8, 2-11. doi:10.1016/j.iotech.2020.09.001
- Freites-Martinez, A., Santana, N., Arias-Santiago, S., & Viera, A. (2021). Using the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE - Version 5.0) to Evaluate the Severity of Adverse Events of Anticancer Therapies. *Actas Dermosifiliogr (Engl Ed)*, 112(1), 90-92. doi:10.1016/j.ad.2019.05.009
- Frey, N., & Porter, D. (2019). Cytokine Release Syndrome with Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*, 25(4), e123-e127. doi:10.1016/j.bbmt.2018.12.756
- Frigault, M. J., Lee, J., Basil, M. C., Carpenito, C., Motohashi, S., Scholler, J., . . . June, C. H. (2015). Identification of chimeric antigen receptors that mediate constitutive or inducible proliferation of T cells. *Cancer Immunol Res*, 3(4), 356-367. doi:10.1158/2326-6066.cir-14-0186
- Fu, W., Lei, C., Ma, Z., Qian, K., Li, T., Zhao, J., & Hu, S. (2021). CAR Macrophages for SARS-CoV-2 Immunotherapy. *Front Immunol*, 12, 669103. doi:10.3389/fimmu.2021.669103
- Fujiwara, K., Tsunei, A., Kusabuka, H., Ogaki, E., Tachibana, M., & Okada, N. (2020). Hinge and Transmembrane Domains of Chimeric Antigen Receptor Regulate Receptor Expression and Signaling Threshold. *Cells*, 9(5). doi:10.3390/cells9051182
- Gabriel, R., Schmidt, M., & von Kalle, C. (2012). Integration of retroviral vectors. *Curr Opin Immunol*, 24(5), 592-597. doi:10.1016/j.coi.2012.08.006
- Gabrilovich, D. I., & Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 9(3), 162-174. doi:10.1038/nri2506
- Garbi, N., Hämmerling, G. J., Probst, H. C., & van den Broek, M. (2010). Tonic T cell signalling and T cell tolerance as opposite effects of self-recognition on dendritic cells. *Curr Opin Immunol*, 22(5), 601-608. doi:10.1016/j.coi.2010.08.007
- Gardner, R., Wu, D., Cherian, S., Fang, M., Hanafi, L. A., Finney, O., . . . Turtle, C. J. (2016). Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood*, 127(20), 2406-2410. doi:10.1182/blood-2015-08-665547
- Gargett, T., & Brown, M. P. (2014). 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*, 5, 235. doi:10.3389/fphar.2014.00235
- Gattinoni, L., Klebanoff, C. A., Palmer, D. C., Wrzesinski, C., Kerstann, K., Yu, Z., . . . Restifo, N. P. (2005). Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *J Clin Invest*, 115(6), 1616-1626. doi:10.1172/jci24480
- Geenen, V. (2021). The thymus and the science of self. *Semin Immunopathol*, 43(1), 5-14. doi:10.1007/s00281-020-00831-y
- Ghanem, M. H., Bolivar-Wagers, S., Dey, B., Hajduczki, A., Vargas-Inchaustegui, D. A., Danielson, D. T., . . . Berger, E. A. (2018). Bispecific chimeric antigen receptors targeting the CD4 binding site and high-mannose Glycans of gp120 optimized for anti-human immunodeficiency virus potency and breadth with minimal immunogenicity. *Cytotherapy*, 20(3), 407-419. doi:10.1016/j.jcyt.2017.11.001
- Ghiringhelli, F., Larmonier, N., Schmitt, E., Parcellier, A., Cathelin, D., Garrido, C., . . . Martin, F. (2004). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol*, 34(2), 336-344. doi:10.1002/eji.200324181

- Ghorashian, S., Kramer, A. M., Onuoha, S., Wright, G., Bartram, J., Richardson, R., . . . Amrolia, P. J. (2019). Enhanced CAR T cell expansion and prolonged persistence in pediatric patients with ALL treated with a low-affinity CD19 CAR. *Nat Med*, *25*(9), 1408-1414. doi:10.1038/s41591-019-0549-5
- Giavridis, T., van der Stegen, S. J. C., Eyquem, J., Hamieh, M., Piersigilli, A., & Sadelain, M. (2018). CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade. *Nat Med*, *24*(6), 731-738. doi:10.1038/s41591-018-0041-7
- Gil, D., & Schrum, A. G. (2013). Strategies to stabilize compact folding and minimize aggregation of antibody-based fragments. *Adv Biosci Biotechnol*, *4*(4a), 73-84. doi:10.4236/abb.2013.44A011
- Globerson Levin, A., Rivière, I., Eshhar, Z., & Sadelain, M. (2021). CAR T cells: Building on the CD19 paradigm. *Eur J Immunol*, *51*(9), 2151-2163. doi:10.1002/eji.202049064
- Goff, S. L., Morgan, R. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Robbins, P. F., Restifo, N. P., . . . Rosenberg, S. A. (2019). Pilot Trial of Adoptive Transfer of Chimeric Antigen Receptor-transduced T Cells Targeting EGFRvIII in Patients With Glioblastoma. *J Immunother*, *42*(4), 126-135. doi:10.1097/cji.0000000000000260
- Golumba-Nagy, V., Kuehle, J., Hombach, A. A., & Abken, H. (2018). CD28- $\zeta$  CAR T Cells Resist TGF- $\beta$  Repression through IL-2 Signaling, Which Can Be Mimicked by an Engineered IL-7 Autocrine Loop. *Mol Ther*, *26*(9), 2218-2230. doi:10.1016/j.ymthe.2018.07.005
- Gratwohl, A., Hermans, J., Apperley, J., Arcese, W., Bacigalupo, A., Bandini, G., . . . et al. (1995). Acute graft-versus-host disease: grade and outcome in patients with chronic myelogenous leukemia. Working Party Chronic Leukemia of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*, *86*(2), 813-818.
- Greenbaum, U., Strati, P., Saliba, R. M., Torres, J., Rondon, G., Nieto, Y., . . . Ahmed, S. (2021). CRP and ferritin in addition to the EASIX score predict CAR-T-related toxicity. *Blood Adv*, *5*(14), 2799-2806. doi:10.1182/bloodadvances.2021004575
- Greenman, R., Pizem, Y., Haus-Cohen, M., Goor, A., Horev, G., Denkberg, G., . . . Reiter, Y. (2021). Shaping Functional Avidity of CAR T Cells: Affinity, Avidity, and Antigen Density That Regulate Response. *Mol Cancer Ther*, *20*(5), 872-884. doi:10.1158/1535-7163.mct-19-1109
- Groom, J. R., & Luster, A. D. (2011). CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res*, *317*(5), 620-631. doi:10.1016/j.yexcr.2010.12.017
- Gu, X., Jia, X., Feng, J., Shen, B., Huang, Y., Geng, S., . . . Long, M. (2010). Molecular modeling and affinity determination of scFv antibody: proper linker peptide enhances its activity. *Ann Biomed Eng*, *38*(2), 537-549. doi:10.1007/s10439-009-9810-2
- Guedan, S., & Alemany, R. (2018). CAR-T Cells and Oncolytic Viruses: Joining Forces to Overcome the Solid Tumor Challenge. *Front Immunol*, *9*, 2460. doi:10.3389/fimmu.2018.02460
- Guedan, S., Chen, X., Madar, A., Carpenito, C., McGettigan, S. E., Frigault, M. J., . . . June, C. H. (2014). ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells. *Blood*, *124*(7), 1070-1080. doi:10.1182/blood-2013-10-535245
- Guedan, S., Posey, A. D., Jr., Shaw, C., Wing, A., Da, T., Patel, P. R., . . . June, C. H. (2018). Enhancing CAR T cell persistence through ICOS and 4-1BB costimulation. *JCI Insight*, *3*(1). doi:10.1172/jci.insight.96976
- Guerra, E., Di Pietro, R., Basile, M., Trerotola, M., & Alberti, S. (2021). Cancer-Homing CAR-T Cells and Endogenous Immune Population Dynamics. *Int J Mol Sci*, *23*(1). doi:10.3390/ijms23010405
- Guo, S., & Deng, C. X. (2018). Effect of Stromal Cells in Tumor Microenvironment on Metastasis Initiation. *Int J Biol Sci*, *14*(14), 2083-2093. doi:10.7150/ijbs.25720



- Guo, T., Feng, Y. L., Xiao, J. J., Liu, Q., Sun, X. N., Xiang, J. F., . . . Xie, A. Y. (2018). Harnessing accurate non-homologous end joining for efficient precise deletion in CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Genome Biol*, *19*(1), 170. doi:10.1186/s13059-018-1518-x
- Gust, J., Ponce, R., Liles, W. C., Garden, G. A., & Turtle, C. J. (2020). Cytokines in CAR T Cell-Associated Neurotoxicity. *Front Immunol*, *11*, 577027. doi:10.3389/fimmu.2020.577027
- Gutierrez-Guerrero, A., Cosset, F. L., & Verhoeven, E. (2020). Lentiviral Vector Pseudotypes: Precious Tools to Improve Gene Modification of Hematopoietic Cells for Research and Gene Therapy. *Viruses*, *12*(9). doi:10.3390/v12091016
- Hale, M., Mesojednik, T., Romano Ibarra, G. S., Sahni, J., Bernard, A., Sommer, K., . . . Wagner, T. A. (2017). Engineering HIV-Resistant, Anti-HIV Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Mol Ther*, *25*(3), 570-579. doi:10.1016/j.ymthe.2016.12.023
- Hamson, E. J., Keane, F. M., Tholen, S., Schilling, O., & Gorrell, M. D. (2014). Understanding fibroblast activation protein (FAP): substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy. *Proteomics Clin Appl*, *8*(5-6), 454-463. doi:10.1002/prca.201300095
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70. doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hao, Z., Li, R., Meng, L., Han, Z., & Hong, Z. (2020). Macrophage, the potential key mediator in CAR-T related CRS. *Exp Hematol Oncol*, *9*, 15. doi:10.1186/s40164-020-00171-5
- Harris, D. T., & Kranz, D. M. (2016). Adoptive T Cell Therapies: A Comparison of T Cell Receptors and Chimeric Antigen Receptors. *Trends Pharmacol Sci*, *37*(3), 220-230. doi:10.1016/j.tips.2015.11.004
- Hassan, G., & Seno, M. (2020). Blood and Cancer: Cancer Stem Cells as Origin of Hematopoietic Cells in Solid Tumor Microenvironments. *Cells*, *9*(5). doi:10.3390/cells9051293
- Haynes, N. M., Snook, M. B., Trapani, J. A., Cerruti, L., Jane, S. M., Smyth, M. J., & Darcy, P. K. (2001). Redirecting mouse CTL against colon carcinoma: superior signaling efficacy of single-chain variable domain chimeras containing TCR-zeta vs Fc epsilon RI-gamma. *J Immunol*, *166*(1), 182-187. doi:10.4049/jimmunol.166.1.182
- He, X., Park, K., Wang, H., He, X., Zhang, Y., Hua, X., . . . Kappes, D. J. (2008). CD4-CD8 lineage commitment is regulated by a silencer element at the ThPOK transcription-factor locus. *Immunity*, *28*(3), 346-358. doi:10.1016/j.immuni.2008.02.006
- Heczey, A., Louis, C. U., Savoldo, B., Dakhova, O., Durett, A., Grilley, B., . . . Brenner, M. K. (2017). CAR T Cells Administered in Combination with Lymphodepletion and PD-1 Inhibition to Patients with Neuroblastoma. *Mol Ther*, *25*(9), 2214-2224. doi:10.1016/j.ymthe.2017.05.012
- Heindryckx, F., & Gerwins, P. (2015). Targeting the tumor stroma in hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*, *7*(2), 165-176. doi:10.4254/wjh.v7.i2.165
- Hindmarsh, P., & Leis, J. (1999). Retroviral DNA integration. *Microbiol Mol Biol Rev*, *63*(4), 836-843, table of contents. doi:10.1128/mmbr.63.4.836-843.1999
- Hinrichs, C. S., Borman, Z. A., Cassard, L., Gattinoni, L., Spolski, R., Yu, Z., . . . Restifo, N. P. (2009). Adoptively transferred effector cells derived from naive rather than central memory CD8+ T cells mediate superior antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(41), 17469-17474. doi:10.1073/pnas.0907448106
- Hirayama, A. V., Gauthier, J., Hay, K. A., Voutsinas, J. M., Wu, Q., Pender, B. S., . . . Turtle, C. J. (2019). High rate of durable complete remission in follicular lymphoma after CD19 CAR-T cell immunotherapy. *Blood*, *134*(7), 636-640. doi:10.1182/blood.2019000905
- Hochweller, K., Wabnitz, G. H., Samstag, Y., Suffner, J., Hämmerling, G. J., & Garbi, N. (2010). Dendritic cells control T cell tonic signaling required for responsiveness to foreign antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(13), 5931-5936. doi:10.1073/pnas.0911877107

- Hong, M., Clubb, J. D., & Chen, Y. Y. (2020). Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy. *Cancer Cell*, *38*(4), 473-488. doi:10.1016/j.ccell.2020.07.005
- Hu, W., Zi, Z., Jin, Y., Li, G., Shao, K., Cai, Q., . . . Wei, F. (2019). CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances human mesothelin-targeted CAR T cell effector functions. *Cancer Immunol Immunother*, *68*(3), 365-377. doi:10.1007/s00262-018-2281-2
- Hudecek, M., Lupo-Stanghellini, M. T., Kosasih, P. L., Sommermeyer, D., Jensen, M. C., Rader, C., & Riddell, S. R. (2013). Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T cells. *Clin Cancer Res*, *19*(12), 3153-3164. doi:10.1158/1078-0432.ccr-13-0330
- Hudecek, M., Sommermeyer, D., Kosasih, P. L., Silva-Benedict, A., Liu, L., Rader, C., . . . Riddell, S. R. (2015). The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. *Cancer Immunol Res*, *3*(2), 125-135. doi:10.1158/2326-6066.cir-14-0127
- Humphrey, M. B., Lanier, L. L., & Nakamura, M. C. (2005). Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone. *Immunol Rev*, *208*, 50-65. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00325.x
- Hurton, L. V., Singh, H., Najjar, A. M., Switzer, K. C., Mi, T., Maiti, S., . . . Cooper, L. J. (2016). Tethered IL-15 augments antitumor activity and promotes a stem-cell memory subset in tumor-specific T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(48), E7788-e7797. doi:10.1073/pnas.1610544113
- Ichiki, Y., Bowlus, C. L., Shimoda, S., Ishibashi, H., Vierling, J. M., & Gershwin, M. E. (2006). T cell immunity and graft-versus-host disease (GVHD). *Autoimmun Rev*, *5*(1), 1-9. doi:10.1016/j.autrev.2005.02.006
- Inaba, H., & Pui, C. H. (2019). Immunotherapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Metastasis Rev*, *38*(4), 595-610. doi:10.1007/s10555-019-09834-0
- Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T. M., Xue, C., Okada, H., & Neilson, E. G. (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest*, *110*(3), 341-350. doi:10.1172/jci15518
- James, S. E., Greenberg, P. D., Jensen, M. C., Lin, Y., Wang, J., Till, B. G., . . . Press, O. W. (2008). Antigen sensitivity of CD22-specific chimeric TCR is modulated by target epitope distance from the cell membrane. *J Immunol*, *180*(10), 7028-7038. doi:10.4049/jimmunol.180.10.7028
- Jayaraman, J., Mellody, M. P., Hou, A. J., Desai, R. P., Fung, A. W., Pham, A. H. T., . . . Zhao, W. (2020). CAR-T design: Elements and their synergistic function. *EBioMedicine*, *58*, 102931. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102931
- Jing, Y., Han, Z., Zhang, S., Liu, Y., & Wei, L. (2011). Epithelial-Mesenchymal Transition in tumor microenvironment. *Cell Biosci*, *1*, 29. doi:10.1186/2045-3701-1-29
- Jo, T., Yoshihara, S., Arai, Y., Ikemoto, J., Onomoto, H., Sugiyama, H., . . . Nagao, M. (2021). [Clinical experience of leukapheresis for CD19 CAR-T cell therapy]. *Rinsho Ketsueki*, *62*(3), 163-169. doi:10.11406/rinketsu.62.163
- John, L. B., Devaud, C., Duong, C. P., Yong, C. S., Beavis, P. A., Haynes, N. M., . . . Darcy, P. K. (2013). Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells. *Clin Cancer Res*, *19*(20), 5636-5646. doi:10.1158/1078-0432.ccr-13-0458
- June, C. H., O'Connor, R. S., Kawalekar, O. U., Ghassemi, S., & Milone, M. C. (2018). CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*, *359*(6382), 1361-1365. doi:10.1126/science.aar6711
- Kaartinen, T., Luostarinen, A., Maliniemi, P., Keto, J., Arvas, M., Belt, H., . . . Korhonen, M. (2017). Low interleukin-2 concentration favors generation of early memory T cells over effector phenotypes during chimeric antigen receptor T-cell expansion. *Cytotherapy*, *19*(6), 689-702. doi:10.1016/j.jcyt.2017.03.067

- Kahlon, K. S., Brown, C., Cooper, L. J., Raubitschek, A., Forman, S. J., & Jensen, M. C. (2004). Specific recognition and killing of glioblastoma multiforme by interleukin 13-zetakine redirected cytolytic T cells. *Cancer Res*, *64*(24), 9160-9166. doi:10.1158/0008-5472.can-04-0454
- Kang, L., Tang, X., Zhang, J., Li, M., Xu, N., Qi, W., . . . Yu, L. (2020). Interleukin-6-knockdown of chimeric antigen receptor-modified T cells significantly reduces IL-6 release from monocytes. *Exp Hematol Oncol*, *9*, 11. doi:10.1186/s40164-020-00166-2
- Kao, R. L., Truscott, L. C., Chiou, T. T., Tsai, W., Wu, A. M., & De Oliveira, S. N. (2019). A Cetuximab-Mediated Suicide System in Chimeric Antigen Receptor-Modified Hematopoietic Stem Cells for Cancer Therapy. *Hum Gene Ther*, *30*(4), 413-428. doi:10.1089/hum.2018.180
- Karlsson, H., Svensson, E., Gigg, C., Jarvius, M., Olsson-Strömberg, U., Savoldo, B., . . . Loskog, A. (2015). Evaluation of Intracellular Signaling Downstream Chimeric Antigen Receptors. *PLoS One*, *10*(12), e0144787. doi:10.1371/journal.pone.0144787
- Kawalekar, O. U., O'Connor, R. S., Fraietta, J. A., Guo, L., McGettigan, S. E., Posey, A. D., Jr., . . . June, C. H. (2016). Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity*, *44*(2), 380-390. doi:10.1016/j.immuni.2016.01.021
- Kent, A., Longino, N. V., Christians, A., & Davila, E. (2021). Naturally Occurring Genetic Alterations in Proximal TCR Signaling and Implications for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*, *12*, 658611. doi:10.3389/fimmu.2021.658611
- Kershaw, M. H., Wang, G., Westwood, J. A., Pachynski, R. K., Tiffany, H. L., Marincola, F. M., . . . Hwu, P. (2002). Redirecting migration of T cells to chemokine secreted from tumors by genetic modification with CXCR2. *Hum Gene Ther*, *13*(16), 1971-1980. doi:10.1089/10430340260355374
- Kistner, L., Doll, D., Holtorf, A., Nitsche, U., & Janssen, K. P. (2017). Interferon-inducible CXC-chemokines are crucial immune modulators and survival predictors in colorectal cancer. *Oncotarget*, *8*(52), 89998-90012. doi:10.18632/oncotarget.21286
- Kochenderfer, J. N., Dudley, M. E., Carpenter, R. O., Kassim, S. H., Rose, J. J., Telford, W. G., . . . Rosenberg, S. A. (2013). Donor-derived CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, *122*(25), 4129-4139. doi:10.1182/blood-2013-08-519413
- Koehler, H., Kofler, D., Hombach, A., & Abken, H. (2007). CD28 costimulation overcomes transforming growth factor-beta-mediated repression of proliferation of redirected human CD4+ and CD8+ T cells in an antitumor cell attack. *Cancer Res*, *67*(5), 2265-2273. doi:10.1158/0008-5472.can-06-2098
- Kofler, D. M., Chmielewski, M., Rappl, G., Hombach, A., Riet, T., Schmidt, A., . . . Abken, H. (2011). CD28 costimulation Impairs the efficacy of a redirected t-cell antitumor attack in the presence of regulatory t cells which can be overcome by preventing Lck activation. *Mol Ther*, *19*(4), 760-767. doi:10.1038/mt.2011.9
- Kondo, K., Ohigashi, I., & Takahama, Y. (2019). Thymus machinery for T-cell selection. *Int Immunol*, *31*(3), 119-125. doi:10.1093/intimm/dxy081
- Korin, Y. D., & Zack, J. A. (1998). Progression to the G1b phase of the cell cycle is required for completion of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in T cells. *J Virol*, *72*(4), 3161-3168. doi:10.1128/jvi.72.4.3161-3168.1998
- Kotch, C., Barrett, D., & Teachey, D. T. (2019). Tocilizumab for the treatment of chimeric antigen receptor T cell-induced cytokine release syndrome. *Expert Rev Clin Immunol*, *15*(8), 813-822. doi:10.1080/1744666x.2019.1629904
- Krenciute, G., Prinzing, B. L., Yi, Z., Wu, M. F., Liu, H., Dotti, G., . . . Gottschalk, S. (2017). Transgenic Expression of IL15 Improves Antiglioma Activity of IL13R $\alpha$ 2-CAR T Cells but

- Results in Antigen Loss Variants. *Cancer Immunol Res*, 5(7), 571-581. doi:10.1158/2326-6066.cir-16-0376
- Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., & Gabrilovich, D. I. (2016). The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol*, 37(3), 208-220. doi:10.1016/j.it.2016.01.004
- Kumaresan, P. R., Manuri, P. R., Albert, N. D., Maiti, S., Singh, H., Mi, T., . . . Cooper, L. J. (2014). Bioengineering T cells to target carbohydrate to treat opportunistic fungal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(29), 10660-10665. doi:10.1073/pnas.1312789111
- Kurd, N., & Robey, E. A. (2016). T-cell selection in the thymus: a spatial and temporal perspective. *Immunol Rev*, 271(1), 114-126. doi:10.1111/imr.12398
- Land, C. A., Musich, P. R., Haydar, D., Krenciute, G., & Xie, Q. (2020). Chimeric antigen receptor T-cell therapy in glioblastoma: charging the T cells to fight. *J Transl Med*, 18(1), 428. doi:10.1186/s12967-020-02598-0
- Larché, M. (2008). Determining MHC restriction of T-cell responses. *Methods Mol Med*, 138, 57-72. doi:10.1007/978-1-59745-366-0\_6
- Larsen, S. K., Gao, Y., & Basse, P. H. (2014). NK cells in the tumor microenvironment. *Crit Rev Oncog*, 19(1-2), 91-105. doi:10.1615/critrevoncog.2014011142
- Lee, D. W., Santomasso, B. D., Locke, F. L., Ghobadi, A., Turtle, C. J., Brudno, J. N., . . . Neelapu, S. S. (2019). ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. *Biol Blood Marrow Transplant*, 25(4), 625-638. doi:10.1016/j.bbmt.2018.12.758
- Lee, J. J., Natsuzaka, M., Ohashi, S., Wong, G. S., Takaoka, M., Michaylira, C. Z., . . . Nakagawa, H. (2010). Hypoxia activates the cyclooxygenase-2-prostaglandin E synthase axis. *Carcinogenesis*, 31(3), 427-434. doi:10.1093/carcin/bgp326
- Lei, X., Lei, Y., Li, J. K., Du, W. X., Li, R. G., Yang, J., . . . Tan, H. B. (2020). Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy. *Cancer Lett*, 470, 126-133. doi:10.1016/j.canlet.2019.11.009
- Leibman, R. S., Richardson, M. W., Ellebrecht, C. T., Maldini, C. R., Glover, J. A., Secreto, A. J., . . . Riley, J. L. (2017). Supraphysiologic control over HIV-1 replication mediated by CD8 T cells expressing a re-engineered CD4-based chimeric antigen receptor. *PLoS Pathog*, 13(10), e1006613. doi:10.1371/journal.ppat.1006613
- Leko, V., & Rosenberg, S. A. (2020). Identifying and Targeting Human Tumor Antigens for T Cell-Based Immunotherapy of Solid Tumors. *Cancer Cell*, 38(4), 454-472. doi:10.1016/j.ccell.2020.07.013
- Levine, B. L., Miskin, J., Wonnacott, K., & Keir, C. (2017). Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 4, 92-101. doi:10.1016/j.omtm.2016.12.006
- Li, H., Yang, C., Cheng, H., Huang, S., & Zheng, Y. (2021). CAR-T cells for Colorectal Cancer: Target-selection and strategies for improved activity and safety. *J Cancer*, 12(6), 1804-1814. doi:10.7150/jca.50509
- Li, H., Zhou, X., Wang, G., Hua, D., Li, S., Xu, T., . . . Li, X. (2022). CAR-T Cells Targeting TSHR Demonstrate Safety and Potent Preclinical Activity Against Differentiated Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 107(4), 1110-1126. doi:10.1210/clinem/dgab819
- Li, L. Z., Sun, Q., Fang, Y., Yang, L. J., Xu, Z. Y., Hu, J. H., . . . Qian, S. X. (2020). A report on Lineage switch at relapse of CD19 CAR-T therapy for Philadelphia chromosome-positive B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Chin Med J (Engl)*, 133(16), 2001-2003. doi:10.1097/cm9.0000000000000962
- Li, P., Yang, L., Li, T., Bin, S., Sun, B., Huang, Y., . . . Li, H. (2020). The Third Generation Anti-HER2 Chimeric Antigen Receptor Mouse T Cells Alone or Together With Anti-PD1 Antibody Inhibits the Growth of Mouse Breast Tumor Cells Expressing HER2 in vitro and in Immune Competent Mice. *Front Oncol*, 10, 1143. doi:10.3389/fonc.2020.01143

- Li, Y., Hermanson, D. L., Moriarity, B. S., & Kaufman, D. S. (2018). Human iPSC-Derived Natural Killer Cells Engineered with Chimeric Antigen Receptors Enhance Anti-tumor Activity. *Cell Stem Cell*, *23*(2), 181-192.e185. doi:10.1016/j.stem.2018.06.002
- Li, Y., Zhao, L., & Li, X. F. (2021). Hypoxia and the Tumor Microenvironment. *Technol Cancer Res Treat*, *20*, 15330338211036304. doi:10.1177/15330338211036304
- Li, Z., Li, D., Tsun, A., & Li, B. (2015). FOXP3+ regulatory T cells and their functional regulation. *Cell Mol Immunol*, *12*(5), 558-565. doi:10.1038/cmi.2015.10
- Liao, Q., He, H., Mao, Y., Ding, X., Zhang, X., & Xu, J. (2020). Engineering T cells with hypoxia-inducible chimeric antigen receptor (HiCAR) for selective tumor killing. *Biomark Res*, *8*(1), 56. doi:10.1186/s40364-020-00238-9
- Lindner, S. E., Johnson, S. M., Brown, C. E., & Wang, L. D. (2020). Chimeric antigen receptor signaling: Functional consequences and design implications. *Sci Adv*, *6*(21), eaaz3223. doi:10.1126/sciadv.aaz3223
- Little, A. M., & Parham, P. (1999). Polymorphism and evolution of HLA class I and II genes and molecules. *Rev Immunogenet*, *1*(1), 105-123.
- Liu, P., Liu, M., Lyu, C., Lu, W., Cui, R., Wang, J., . . . Yang, D. (2020). Acute Graft-Versus-Host Disease After Humanized Anti-CD19-CAR T Therapy in Relapsed B-ALL Patients After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant. *Front Oncol*, *10*, 573822. doi:10.3389/fonc.2020.573822
- Liu, T., Men, Q., Su, X., Chen, W., Zou, L., Li, Q., . . . Yang, A. (2017). Downregulated expression of TSHR is associated with distant metastasis in thyroid cancer. *Oncol Lett*, *14*(6), 7506-7512. doi:10.3892/ol.2017.7122
- Liu, X., Jiang, S., Fang, C., Yang, S., Olalere, D., Pequignot, E. C., . . . Zhao, Y. (2015). Affinity-Tuned ErbB2 or EGFR Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit an Increased Therapeutic Index against Tumors in Mice. *Cancer Res*, *75*(17), 3596-3607. doi:10.1158/0008-5472.can-15-0159
- Liu, Y., Zhou, Y., Huang, K. H., Li, Y., Fang, X., An, L., . . . Zhang, J. (2019). EGFR-specific CAR-T cells trigger cell lysis in EGFR-positive TNBC. *Aging (Albany NY)*, *11*(23), 11054-11072. doi:10.18632/aging.102510
- Lo, A., Li, C. P., Buza, E. L., Blomberg, R., Govindaraju, P., Avery, D., . . . Puré, E. (2017). Fibroblast activation protein augments progression and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *JCI Insight*, *2*(19). doi:10.1172/jci.insight.92232
- Long, A. H., Haso, W. M., Shern, J. F., Wanhainen, K. M., Murgai, M., Ingaramo, M., . . . Mackall, C. L. (2015). 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med*, *21*(6), 581-590. doi:10.1038/nm.3838
- Lotz, C., Ferreira, E. A., Drexler, I., Mutallib, S. A., Huber, C., Sutter, G., & Theobald, M. (2004). Partial tyrosinase-specific self tolerance by HLA-A\*0201-restricted cytotoxic T lymphocytes in mice and man. *Int J Cancer*, *108*(4), 571-579. doi:10.1002/ijc.11602
- Louault, K., Li, R. R., & DeClerck, Y. A. (2020). Cancer-Associated Fibroblasts: Understanding Their Heterogeneity. *Cancers (Basel)*, *12*(11). doi:10.3390/cancers12113108
- Lund, F. E. (2008). Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. *Curr Opin Immunol*, *20*(3), 332-338. doi:10.1016/j.coi.2008.03.003
- Lynn, R. C., Feng, Y., Schutsky, K., Poussin, M., Kalota, A., Dimitrov, D. S., & Powell, D. J., Jr. (2016). High-affinity FR $\beta$ -specific CAR T cells eradicate AML and normal myeloid lineage without HSC toxicity. *Leukemia*, *30*(6), 1355-1364. doi:10.1038/leu.2016.35
- Ma, M. T., Badeti, S., Chen, C. H., Kim, J., Choudhary, A., Honnen, B., . . . Liu, D. (2021). CAR-NK Cells Effectively Target SARS-CoV-2-Spike-Expressing Cell Lines In Vitro. *Front Immunol*, *12*, 652223. doi:10.3389/fimmu.2021.652223

- Ma, S., Li, X., Wang, X., Cheng, L., Li, Z., Zhang, C., . . . Qian, Q. (2019). Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors. *Int J Biol Sci*, *15*(12), 2548-2560. doi:10.7150/ijbs.34213
- Ma, Y., Shurin, G. V., Peiyuan, Z., & Shurin, M. R. (2013). Dendritic cells in the cancer microenvironment. *J Cancer*, *4*(1), 36-44. doi:10.7150/jca.5046
- Macian, F. (2005). NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol*, *5*(6), 472-484. doi:10.1038/nri1632
- Magee, M. S., Abraham, T. S., Baybutt, T. R., Flickinger, J. C., Jr., Ridge, N. A., Marszalowicz, G. P., . . . Snook, A. E. (2018). Human GUCY2C-Targeted Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Expressing T Cells Eliminate Colorectal Cancer Metastases. *Cancer Immunol Res*, *6*(5), 509-516. doi:10.1158/2326-6066.cir-16-0362
- Maggs, L., Cattaneo, G., Dal, A. E., Moghaddam, A. S., & Ferrone, S. (2021). CAR T Cell-Based Immunotherapy for the Treatment of Glioblastoma. *Front Neurosci*, *15*, 662064. doi:10.3389/fnins.2021.662064
- Magnani, C. F., Gaipa, G., Lussana, F., Belotti, D., Gritti, G., Napolitano, S., . . . Biondi, A. (2020). Sleeping Beauty-engineered CAR T cells achieve antileukemic activity without severe toxicities. *J Clin Invest*, *130*(11), 6021-6033. doi:10.1172/jci138473
- Magnani, C. F., Tettamanti, S., Alberti, G., Pisani, I., Biondi, A., Serafini, M., & Gaipa, G. (2020). Transposon-Based CAR T Cells in Acute Leukemias: Where are We Going? *Cells*, *9*(6). doi:10.3390/cells9061337
- Maher, J., Brentjens, R. J., Gunset, G., Rivière, I., & Sadelain, M. (2002). Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol*, *20*(1), 70-75. doi:10.1038/nbt0102-70
- Maimela, N. R., Liu, S., & Zhang, Y. (2019). Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment. *Comput Struct Biotechnol J*, *17*, 1-13. doi:10.1016/j.csbj.2018.11.004
- Major, A., Collins, J., Craney, C., Heitman, A. K., Bauer, E., Zerante, E., . . . Jasieliec, J. (2021). Management of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) associated with chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) therapy using anti-cytokine therapy: an illustrative case and review of the literature. *Leuk Lymphoma*, *62*(7), 1765-1769. doi:10.1080/10428194.2021.1881507
- Majzner, R. G., & Mackall, C. L. (2018). Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy. *Cancer Discov*, *8*(10), 1219-1226. doi:10.1158/2159-8290.cd-18-0442
- Majzner, R. G., Rietberg, S. P., Sotillo, E., Dong, R., Vachharajani, V. T., Labanieh, L., . . . Mackall, C. L. (2020). Tuning the Antigen Density Requirement for CAR T-cell Activity. *Cancer Discov*, *10*(5), 702-723. doi:10.1158/2159-8290.cd-19-0945
- Maldini, C. R., Ellis, G. I., & Riley, J. L. (2018). CAR T cells for infection, autoimmunity and allotransplantation. *Nat Rev Immunol*, *18*(10), 605-616. doi:10.1038/s41577-018-0042-2
- Mao, Y., Keller, E. T., Garfield, D. H., Shen, K., & Wang, J. (2013). Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*, *32*(1-2), 303-315. doi:10.1007/s10555-012-9415-3
- Marcuzzi, E., Angioni, R., Molon, B., & Cali, B. (2018). Chemokines and Chemokine Receptors: Orchestrating Tumor Metastasis. *Int J Mol Sci*, *20*(1). doi:10.3390/ijms20010096
- Mardiros, A., Forman, S. J., & Budde, L. E. (2015). T cells expressing CD123 chimeric antigen receptors for treatment of acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol*, *22*(6), 484-488. doi:10.1097/moh.0000000000000190
- Mariuzza, R. A., Agnihotri, P., & Orban, J. (2020). The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma. *J Biol Chem*, *295*(4), 914-925. doi:10.1074/jbc.REV119.009411

- Marofi, F., Motavalli, R., Safonov, V. A., Thangavelu, L., Yumashev, A. V., Alexander, M., . . . Khiavi, F. M. (2021). CAR T cells in solid tumors: challenges and opportunities. *Stem Cell Res Ther*, *12*(1), 81. doi:10.1186/s13287-020-02128-1
- Martín-Rojas, R. M., Gómez-Centurión, I., Bailén, R., Bastos, M., Diaz-Crespo, F., Carbonell, D., . . . Kwon, M. (2022). Hemophagocytic lymphohistiocytosis/macrophage activation syndrome (HLH/MAS) following treatment with tisagenlecleucel. *Clin Case Rep*, *10*(1), e05209. doi:10.1002/ccr3.5209
- Martinet, L., Le Guellec, S., Filleron, T., Lamant, L., Meyer, N., Rochaix, P., . . . Girard, J. P. (2012). High endothelial venules (HEVs) in human melanoma lesions: Major gateways for tumor-infiltrating lymphocytes. *Oncoimmunology*, *1*(6), 829-839. doi:10.4161/onci.20492
- Martinez, M., & Moon, E. K. (2019). CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*, *10*, 128. doi:10.3389/fimmu.2019.00128
- Marvel, D., & Gabrilovich, D. I. (2015). Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *J Clin Invest*, *125*(9), 3356-3364. doi:10.1172/jci80005
- Masucci, M. T., Minopoli, M., & Carriero, M. V. (2019). Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Front Oncol*, *9*, 1146. doi:10.3389/fonc.2019.01146
- Maude, S. L., Frey, N., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Bunin, N. J., . . . Grupp, S. A. (2014). Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*, *371*(16), 1507-1517. doi:10.1056/NEJMoa1407222
- Maus, M. V., Fraietta, J. A., Levine, B. L., Kalos, M., Zhao, Y., & June, C. H. (2014). Adoptive immunotherapy for cancer or viruses. *Annu Rev Immunol*, *32*, 189-225. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120136
- Mei, H., Li, C., Jiang, H., Zhao, X., Huang, Z., Jin, D., . . . Hu, Y. (2021). A bispecific CAR-T cell therapy targeting BCMA and CD38 in relapsed or refractory multiple myeloma. *J Hematol Oncol*, *14*(1), 161. doi:10.1186/s13045-021-01170-7
- Michaeli, Y., Sinik, K., Haus-Cohen, M., & Reiter, Y. (2012). Melanoma cells present high levels of HLA-A2-tyrosinase in association with instability and aberrant intracellular processing of tyrosinase. *Eur J Immunol*, *42*(4), 842-850. doi:10.1002/eji.201141511
- Milone, M. C., & O'Doherty, U. (2018). Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*, *32*(7), 1529-1541. doi:10.1038/s41375-018-0106-0
- Min, I. M., Shevlin, E., Vedvyas, Y., Zaman, M., Wyrwas, B., Scognamiglio, T., . . . Jin, M. M. (2017). CAR T Therapy Targeting ICAM-1 Eliminates Advanced Human Thyroid Tumors. *Clin Cancer Res*, *23*(24), 7569-7583. doi:10.1158/1078-0432.ccr-17-2008
- Minagawa, K., Al-Obaidi, M., & Di Stasi, A. (2019). Generation of Suicide Gene-Modified Chimeric Antigen Receptor-Redirected T-Cells for Cancer Immunotherapy. *Methods Mol Biol*, *1895*, 57-73. doi:10.1007/978-1-4939-8922-5\_5
- Moon, E. K., Wang, L. S., Bekdache, K., Lynn, R. C., Lo, A., Thorne, S. H., & Albelda, S. M. (2018). Intra-tumoral delivery of CXCL11 via a vaccinia virus, but not by modified T cells, enhances the efficacy of adoptive T cell therapy and vaccines. *Oncoimmunology*, *7*(3), e1395997. doi:10.1080/2162402x.2017.1395997
- Morello, A., Sadelain, M., & Adusumilli, P. S. (2016). Mesothelin-Targeted CARs: Driving T Cells to Solid Tumors. *Cancer Discov*, *6*(2), 133-146. doi:10.1158/2159-8290.cd-15-0583
- Morgan, M. A., Büning, H., Sauer, M., & Schambach, A. (2020). Use of Cell and Genome Modification Technologies to Generate Improved "Off-the-Shelf" CAR T and CAR NK Cells. *Front Immunol*, *11*, 1965. doi:10.3389/fimmu.2020.01965
- Morgan, R. A., & Boyerinas, B. (2016). Genetic Modification of T Cells. *Biomedicines*, *4*(2). doi:10.3390/biomedicines4020009

- Morgan, R. A., Yang, J. C., Kitano, M., Dudley, M. E., Laurencot, C. M., & Rosenberg, S. A. (2010). Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*, *18*(4), 843-851. doi:10.1038/mt.2010.24
- Morris, E. C., Neelapu, S. S., Giavridis, T., & Sadelain, M. (2022). Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, *22*(2), 85-96. doi:10.1038/s41577-021-00547-6
- Mousset, C. M., Hobo, W., Woestenenk, R., Preijers, F., Dolstra, H., & van der Waart, A. B. (2019). Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. *Cytometry A*, *95*(6), 647-654. doi:10.1002/cyto.a.23724
- Muller, Y. D., Nguyen, D. P., Ferreira, L. M. R., Ho, P., Raffin, C., Valencia, R. V. B., . . . Tang, Q. (2021). The CD28-Transmembrane Domain Mediates Chimeric Antigen Receptor Heterodimerization With CD28. *Front Immunol*, *12*, 639818. doi:10.3389/fimmu.2021.639818
- Myers, D. R., Zikherman, J., & Roose, J. P. (2017). Tonic Signals: Why Do Lymphocytes Bother? *Trends Immunol*, *38*(11), 844-857. doi:10.1016/j.it.2017.06.010
- Myers, J. A., & Miller, J. S. (2021). Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*, *18*(2), 85-100. doi:10.1038/s41571-020-0426-7
- Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., . . . Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, *272*(5259), 263-267. doi:10.1126/science.272.5259.263
- Narayan, V., Barber-Rotenberg, J. S., Jung, I. Y., Lacey, S. F., Rech, A. J., Davis, M. M., . . . Haas, N. B. (2022). PSMA-targeting TGF $\beta$ -insensitive armored CAR T cells in metastatic castration-resistant prostate cancer: a phase 1 trial. *Nat Med*, *28*(4), 724-734. doi:10.1038/s41591-022-01726-1
- Neelapu, S. S. (2019). Managing the toxicities of CAR T-cell therapy. *Hematol Oncol*, *37* Suppl 1, 48-52. doi:10.1002/hon.2595
- Ohno, M., Ohkuri, T., Kosaka, A., Tanahashi, K., June, C. H., Natsume, A., & Okada, H. (2013). Expression of miR-17-92 enhances anti-tumor activity of T-cells transduced with the anti-EGFRvIII chimeric antigen receptor in mice bearing human GBM xenografts. *J Immunother Cancer*, *1*, 21. doi:10.1186/2051-1426-1-21
- Olkhanud, P. B., Damdinsuren, B., Bodogai, M., Gress, R. E., Sen, R., Wejksza, K., . . . Biragyn, A. (2011). Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4<sup>+</sup> T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res*, *71*(10), 3505-3515. doi:10.1158/0008-5472.can-10-4316
- Orlando, E. J., Han, X., Tribouley, C., Wood, P. A., Leary, R. J., Riester, M., . . . Winckler, W. (2018). Genetic mechanisms of target antigen loss in CAR19 therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*, *24*(10), 1504-1506. doi:10.1038/s41591-018-0146-z
- Pallegar, N. K., & Christian, S. L. (2020). Adipocytes in the Tumour Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*, *1234*, 1-13. doi:10.1007/978-3-030-37184-5\_1
- Palmer, E. (2003). Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol*, *3*(5), 383-391. doi:10.1038/nri1085
- Pan, J., Zuo, S., Deng, B., Xu, X., Li, C., Zheng, Q., . . . Tong, C. (2020). Sequential CD19-22 CAR T therapy induces sustained remission in children with r/r B-ALL. *Blood*, *135*(5), 387-391. doi:10.1182/blood.2019003293
- Park, J. H., Rivière, I., Gonen, M., Wang, X., Sénéchal, B., Curran, K. J., . . . Sadelain, M. (2018). Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*, *378*(5), 449-459. doi:10.1056/NEJMoa1709919



- Park, S., Shevlin, E., Vedvyas, Y., Zaman, M., Park, S., Hsu, Y. S., . . . Jin, M. M. (2017). Micromolar affinity CAR T cells to ICAM-1 achieves rapid tumor elimination while avoiding systemic toxicity. *Sci Rep*, *7*(1), 14366. doi:10.1038/s41598-017-14749-3
- Pegram, H. J., Lee, J. C., Hayman, E. G., Imperato, G. H., Tedder, T. F., Sadelain, M., & Brentjens, R. J. (2012). Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood*, *119*(18), 4133-4141. doi:10.1182/blood-2011-12-400044
- Peranzoni, E., Lemoine, J., Vimeux, L., Feuillet, V., Barrin, S., Kantari-Mimoun, C., . . . Donnadieu, E. (2018). Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *115*(17), E4041-e4050. doi:10.1073/pnas.1720948115
- Peterlin, P., Garnier, A., Le Bourgeois, A., Jullien, M., Seguin, A., Eveillard, M., . . . Chevallier, P. (2022). Dramatic recovery after etoposide phosphate infusion for hemophagocytic lymphohistiocytosis/macrophage activation syndrome following treatment with tisagenlecleucel in a young patient with relapsed acute lymphoblastic leukemia: a case report. *Acta Haematol*. doi:10.1159/000525576
- Porter, D., Frey, N., Wood, P. A., Weng, Y., & Grupp, S. A. (2018). Grading of cytokine release syndrome associated with the CAR T cell therapy tisagenlecleucel. *J Hematol Oncol*, *11*(1), 35. doi:10.1186/s13045-018-0571-y
- Priceman, S. J., Tilakawardane, D., Jeang, B., Aguilar, B., Murad, J. P., Park, A. K., . . . Brown, C. E. (2018). Regional Delivery of Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells Effectively Targets HER2(+) Breast Cancer Metastasis to the Brain. *Clin Cancer Res*, *24*(1), 95-105. doi:10.1158/1078-0432.ccr-17-2041
- Pulè, M. A., Straathof, K. C., Dotti, G., Heslop, H. E., Rooney, C. M., & Brenner, M. K. (2005). A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol Ther*, *12*(5), 933-941. doi:10.1016/j.ymthe.2005.04.016
- Qasim, W., Zhan, H., Samarasinghe, S., Adams, S., Amrolia, P., Stafford, S., . . . Veys, P. (2017). Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med*, *9*(374). doi:10.1126/scitranslmed.aaj2013
- Qiu, S., Pan, Y., Shi, S., Omotoyosi, F. F., Chen, K., Guo, Z., & Lü, P. (2022). Genetic Mechanism of Leukemia Relapse Following CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy. *Cancer Biother Radiopharm*, *37*(5), 335-341. doi:10.1089/cbr.2020.4630
- Quintarelli, C., Orlando, D., Boffa, I., Guercio, M., Polito, V. A., Petretto, A., . . . Caruana, I. (2018). Choice of costimulatory domains and of cytokines determines CAR T-cell activity in neuroblastoma. *Oncoimmunology*, *7*(6), e1433518. doi:10.1080/2162402x.2018.1433518
- Ramos, C. A., & Dotti, G. (2011). Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther*, *11*(7), 855-873. doi:10.1517/14712598.2011.573476
- Ramos, C. A., Rouse, R., Robertson, C. S., Reyna, A., Narala, N., Vyas, G., . . . Dotti, G. (2018). In Vivo Fate and Activity of Second- versus Third-Generation CD19-Specific CAR-T Cells in B Cell Non-Hodgkin's Lymphomas. *Mol Ther*, *26*(12), 2727-2737. doi:10.1016/j.ymthe.2018.09.009
- Riaz, I. B., Zahid, U., Kamal, M. U., Husnain, M., McBride, A., Hua, A., . . . Anwer, F. (2017). Anti-CD 19 and anti-CD 20 CAR-modified T cells for B-cell malignancies: a systematic review and meta-analysis. *Immunotherapy*, *9*(12), 979-993. doi:10.2217/imt-2017-0062
- Ribas, A., & Hu-Lieskovan, S. (2016). What does PD-L1 positive or negative mean? *J Exp Med*, *213*(13), 2835-2840. doi:10.1084/jem.20161462
- Richards, R. M., Sotillo, E., & Majzner, R. G. (2018). CAR T Cell Therapy for Neuroblastoma. *Front Immunol*, *9*, 2380. doi:10.3389/fimmu.2018.02380

- Richman, S. A., Nunez-Cruz, S., Moghimi, B., Li, L. Z., Gershenson, Z. T., Mourelatos, Z., . . . Milone, M. C. (2018). High-Affinity GD2-Specific CAR T Cells Induce Fatal Encephalitis in a Preclinical Neuroblastoma Model. *Cancer Immunol Res*, *6*(1), 36-46. doi:10.1158/2326-6066.cir-17-0211
- Rivière, I., & Sadelain, M. (2017). Chimeric Antigen Receptors: A Cell and Gene Therapy Perspective. *Mol Ther*, *25*(5), 1117-1124. doi:10.1016/j.ymthe.2017.03.034
- Rodriguez-Garcia, A., Palazon, A., Noguera-Ortega, E., Powell, D. J., Jr., & Guedan, S. (2020). CAR-T Cells Hit the Tumor Microenvironment: Strategies to Overcome Tumor Escape. *Front Immunol*, *11*, 1109. doi:10.3389/fimmu.2020.01109
- Rohaan, M. W., van den Berg, J. H., Kvistborg, P., & Haanen, J. (2018). Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a viable treatment option. *J Immunother Cancer*, *6*(1), 102. doi:10.1186/s40425-018-0391-1
- Roife, D., Sarcar, B., & Fleming, J. B. (2020). Stellate Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*, *1263*, 67-84. doi:10.1007/978-3-030-44518-8\_6
- Rosenberg, S. A., Restifo, N. P., Yang, J. C., Morgan, R. A., & Dudley, M. E. (2008). Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, *8*(4), 299-308. doi:10.1038/nrc2355
- Rosy, J., Williamson, D. J., & Gaus, K. (2012). How does the kinase Lck phosphorylate the T cell receptor? Spatial organization as a regulatory mechanism. *Front Immunol*, *3*, 167. doi:10.3389/fimmu.2012.00167
- Rubin, D. B., Danish, H. H., Ali, A. B., Li, K., LaRose, S., Monk, A. D., . . . Vaitkevicius, H. (2019). Neurological toxicities associated with chimeric antigen receptor T-cell therapy. *Brain*, *142*(5), 1334-1348. doi:10.1093/brain/awz053
- Ruella, M., Klichinsky, M., Kenderian, S. S., Shestova, O., Ziober, A., Kraft, D. O., . . . Gill, S. (2017). Overcoming the Immunosuppressive Tumor Microenvironment of Hodgkin Lymphoma Using Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Cancer Discov*, *7*(10), 1154-1167. doi:10.1158/2159-8290.cd-16-0850
- Sadelain, M., Brentjens, R., & Rivière, I. (2013). The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov*, *3*(4), 388-398. doi:10.1158/2159-8290.cd-12-0548
- Sadeqi Nezhad, M., Abdollahpour-Alitappeh, M., Rezaei, B., Yazdanifar, M., & Seifalian, A. M. (2021). Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) Provide a Potentially Unlimited T Cell Source for CAR-T Cell Development and Off-the-Shelf Products. *Pharm Res*, *38*(6), 931-945. doi:10.1007/s11095-021-03067-z
- Safarzadeh Kozani, P., Safarzadeh Kozani, P., & Rahbarizadeh, F. (2021). Optimizing the Clinical Impact of CAR-T Cell Therapy in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Looking Back While Moving Forward. *Front Immunol*, *12*, 765097. doi:10.3389/fimmu.2021.765097
- Sahai, E., Astsaturov, I., Cukierman, E., DeNardo, D. G., Egeblad, M., Evans, R. M., . . . Werb, Z. (2020). A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*, *20*(3), 174-186. doi:10.1038/s41568-019-0238-1
- Saied, A., Licata, L., Burga, R. A., Thorn, M., McCormack, E., Stainken, B. F., . . . Katz, S. C. (2014). Neutrophil:lymphocyte ratios and serum cytokine changes after hepatic artery chimeric antigen receptor-modified T-cell infusions for liver metastases. *Cancer Gene Ther*, *21*(11), 457-462. doi:10.1038/cgt.2014.50
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., & Hafler, D. A. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*, *10*(7), 490-500. doi:10.1038/nri2785
- Salter, A. I., Ivey, R. G., Kennedy, J. J., Voillet, V., Rajan, A., Alderman, E. J., . . . Riddell, S. R. (2018). Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function. *Sci Signal*, *11*(544). doi:10.1126/scisignal.aat6753

- Sanber, K., Savani, B., & Jain, T. (2021). Graft-versus-host disease risk after chimeric antigen receptor T-cell therapy: the diametric opposition of T cells. *Br J Haematol*, *195*(5), 660-668. doi:10.1111/bjh.17544
- Sánchez-Jiménez, F., Pérez-Pérez, A., de la Cruz-Merino, L., & Sánchez-Margalet, V. (2019). Obesity and Breast Cancer: Role of Leptin. *Front Oncol*, *9*, 596. doi:10.3389/fonc.2019.00596
- Santomasso, B., Bachier, C., Westin, J., Rezvani, K., & Shpall, E. J. (2019). The Other Side of CAR T-Cell Therapy: Cytokine Release Syndrome, Neurologic Toxicity, and Financial Burden. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, *39*, 433-444. doi:10.1200/edbk\_238691
- Sautto, G. A., Wisskirchen, K., Clementi, N., Castelli, M., Diotti, R. A., Graf, J., . . . Mancini, N. (2016). Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered T cells redirected against hepatitis C virus (HCV) E2 glycoprotein. *Gut*, *65*(3), 512-523. doi:10.1136/gutjnl-2014-308316
- Schubert, M. L., Schmitt, M., Wang, L., Ramos, C. A., Jordan, K., Müller-Tidow, C., & Dreger, P. (2021). Side-effect management of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy. *Ann Oncol*, *32*(1), 34-48. doi:10.1016/j.annonc.2020.10.478
- Seif, M., Einsele, H., & Löffler, J. (2019). CAR T Cells Beyond Cancer: Hope for Immunomodulatory Therapy of Infectious Diseases. *Front Immunol*, *10*, 2711. doi:10.3389/fimmu.2019.02711
- Seo, W., & Taniuchi, I. (2016). Transcriptional regulation of early T-cell development in the thymus. *Eur J Immunol*, *46*(3), 531-538. doi:10.1002/eji.201545821
- Sermer, D., & Brentjens, R. (2019). CAR T-cell therapy: Full speed ahead. *Hematol Oncol*, *37 Suppl 1*, 95-100. doi:10.1002/hon.2591
- Shah, N. N., Highfill, S. L., Shalabi, H., Yates, B., Jin, J., Wolters, P. L., . . . Fry, T. J. (2020). CD4/CD8 T-Cell Selection Affects Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Potency and Toxicity: Updated Results From a Phase I Anti-CD22 CAR T-Cell Trial. *J Clin Oncol*, *38*(17), 1938-1950. doi:10.1200/jco.19.03279
- Shah, N. N., Johnson, B. D., Schneider, D., Zhu, F., Szabo, A., Keever-Taylor, C. A., . . . Hari, P. (2020). Bispecific anti-CD20, anti-CD19 CAR T cells for relapsed B cell malignancies: a phase 1 dose escalation and expansion trial. *Nat Med*, *26*(10), 1569-1575. doi:10.1038/s41591-020-1081-3
- Shah, N. N., Maatman, T., Hari, P., & Johnson, B. (2019). Multi Targeted CAR-T Cell Therapies for B-Cell Malignancies. *Front Oncol*, *9*, 146. doi:10.3389/fonc.2019.00146
- Shameli, A., Yamanouchi, J., Tsai, S., Yang, Y., Clemente-Casares, X., Moore, A., . . . Santamaria, P. (2013). IL-2 promotes the function of memory-like autoregulatory CD8+ T cells but suppresses their development via FoxP3+ Treg cells. *Eur J Immunol*, *43*(2), 394-403. doi:10.1002/eji.201242845
- Shan, D., Press, O. W., Tsu, T. T., Hayden, M. S., & Ledbetter, J. A. (1999). Characterization of scFv-Ig constructs generated from the anti-CD20 mAb 1F5 using linker peptides of varying lengths. *J Immunol*, *162*(11), 6589-6595.
- Sharpe, A. H. (2009). Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev*, *229*(1), 5-11. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00784.x
- Shen, L., Li, H., Bin, S., Li, P., Chen, J., Gu, H., & Yuan, W. (2019). The efficacy of third generation anti-HER2 chimeric antigen receptor T cells in combination with PD1 blockade against malignant glioblastoma cells. *Oncol Rep*, *42*(4), 1549-1557. doi:10.3892/or.2019.7263
- Shen, Z., Yan, H., Zhang, Y., Mernaugh, R. L., & Zeng, X. (2008). Engineering peptide linkers for scFv immunosensors. *Anal Chem*, *80*(6), 1910-1917. doi:10.1021/ac7018624
- Sheth, V. S., & Gauthier, J. (2021). Taming the beast: CRS and ICANS after CAR T-cell therapy for ALL. *Bone Marrow Transplant*, *56*(3), 552-566. doi:10.1038/s41409-020-01134-4
- Simeoni, L. (2017). Lck activation: puzzling the pieces together. *Oncotarget*, *8*(61), 102761-102762. doi:10.18632/oncotarget.22309

- Singh, H., Moyes, J. S., Huls, M. H., & Cooper, L. J. (2015). Manufacture of T cells using the Sleeping Beauty system to enforce expression of a CD19-specific chimeric antigen receptor. *Cancer Gene Ther*, 22(2), 95-100. doi:10.1038/cgt.2014.69
- Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A., & Jordan, M. S. (2009). T cell activation. *Annu Rev Immunol*, 27, 591-619. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132706
- Smith, C. C., Selitsky, S. R., Chai, S., Armistead, P. M., Vincent, B. G., & Serody, J. S. (2019). Alternative tumour-specific antigens. *Nat Rev Cancer*, 19(8), 465-478. doi:10.1038/s41568-019-0162-4
- Smith, M., Zakrzewski, J., James, S., & Sadelain, M. (2018). Posttransplant chimeric antigen receptor therapy. *Blood*, 131(10), 1045-1052. doi:10.1182/blood-2017-08-752121
- Sokolosky, J. T., Trotta, E., Parisi, G., Picton, L., Su, L. L., Le, A. C., . . . Garcia, K. C. (2018). Selective targeting of engineered T cells using orthogonal IL-2 cytokine-receptor complexes. *Science*, 359(6379), 1037-1042. doi:10.1126/science.aar3246
- Sommermeier, D., Hudecek, M., Kosasih, P. L., Gogishvili, T., Maloney, D. G., Turtle, C. J., & Riddell, S. R. (2016). Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia*, 30(2), 492-500. doi:10.1038/leu.2015.247
- Sotillo, E., Barrett, D. M., Black, K. L., Bagashev, A., Oldridge, D., Wu, G., . . . Thomas-Tikhonenko, A. (2015). Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discov*, 5(12), 1282-1295. doi:10.1158/2159-8290.cd-15-1020
- Spear, P., Barber, A., Rynda-Apelle, A., & Sentman, C. L. (2012). Chimeric antigen receptor T cells shape myeloid cell function within the tumor microenvironment through IFN- $\gamma$  and GM-CSF. *J Immunol*, 188(12), 6389-6398. doi:10.4049/jimmunol.1103019
- Spiegel, J. Y., Patel, S., Muffly, L., Hossain, N. M., Oak, J., Baird, J. H., . . . Miklos, D. B. (2021). CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in adult patients with recurrent or refractory B cell malignancies: a phase 1 trial. *Nat Med*, 27(8), 1419-1431. doi:10.1038/s41591-021-01436-0
- Srivastava, S., & Riddell, S. R. (2015). Engineering CAR-T cells: Design concepts. *Trends Immunol*, 36(8), 494-502. doi:10.1016/j.it.2015.06.004
- Steinman, R. M., & Hemmi, H. (2006). Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*, 311, 17-58. doi:10.1007/3-540-32636-7\_2
- Sterner, R. C., & Sterner, R. M. (2021). CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J*, 11(4), 69. doi:10.1038/s41408-021-00459-7
- Subklewe, M. (2021). BiTEs better than CAR T cells. *Blood Adv*, 5(2), 607-612. doi:10.1182/bloodadvances.2020001792
- Subklewe, M., von Bergwelt-Baildon, M., & Humpe, A. (2019). Chimeric Antigen Receptor T Cells: A Race to Revolutionize Cancer Therapy. *Transfus Med Hemother*, 46(1), 15-24. doi:10.1159/000496870
- Suhoski, M. M., Golovina, T. N., Aqui, N. A., Tai, V. C., Varela-Rohena, A., Milone, M. C., . . . June, C. H. (2007). Engineering artificial antigen-presenting cells to express a diverse array of co-stimulatory molecules. *Mol Ther*, 15(5), 981-988. doi:10.1038/mt.sj.6300134
- Sun, S., Hao, H., Yang, G., Zhang, Y., & Fu, Y. (2018). Immunotherapy with CAR-Modified T Cells: Toxicities and Overcoming Strategies. *J Immunol Res*, 2018, 2386187. doi:10.1155/2018/2386187
- Sunder-Plassmann, R., Lialios, F., Madsen, M., Koyasu, S., & Reinherz, E. L. (1997). Functional analysis of immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-mediated signal transduction: the two YxxL segments within a single CD3zeta-ITAM are functionally distinct. *Eur J Immunol*, 27(8), 2001-2009. doi:10.1002/eji.1830270826

- Taheri, F., Ochoa, J. B., Faghiri, Z., Culotta, K., Park, H. J., Lan, M. S., . . . Ochoa, A. C. (2001). L-Arginine regulates the expression of the T-cell receptor zeta chain (CD3zeta) in Jurkat cells. *Clin Cancer Res*, 7(3 Suppl), 958s-965s.
- Tang, N., Cheng, C., Zhang, X., Qiao, M., Li, N., Mu, W., . . . Wang, H. (2020). TGF- $\beta$  inhibition via CRISPR promotes the long-term efficacy of CAR T cells against solid tumors. *JCI Insight*, 5(4). doi:10.1172/jci.insight.133977
- Tang, X. Y., Sun, Y., Zhang, A., Hu, G. L., Cao, W., Wang, D. H., . . . Chen, H. (2016). Third-generation CD28/4-1BB chimeric antigen receptor T cells for chemotherapy relapsed or refractory acute lymphoblastic leukaemia: a non-randomised, open-label phase I trial protocol. *BMJ Open*, 6(12), e013904. doi:10.1136/bmjopen-2016-013904
- Taniuchi, I. (2018). CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annu Rev Immunol*, 36, 579-601. doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053411
- Tavernier, G., Andries, O., Demeester, J., Sanders, N. N., De Smedt, S. C., & Rejman, J. (2011). mRNA as gene therapeutic: how to control protein expression. *J Control Release*, 150(3), 238-247. doi:10.1016/j.jconrel.2010.10.020
- Tay, R. E., Richardson, E. K., & Toh, H. C. (2021). Revisiting the role of CD4(+) T cells in cancer immunotherapy-new insights into old paradigms. *Cancer Gene Ther*, 28(1-2), 5-17. doi:10.1038/s41417-020-0183-x
- Tchou, J., Zhao, Y., Levine, B. L., Zhang, P. J., Davis, M. M., Melenhorst, J. J., . . . June, C. H. (2017). Safety and Efficacy of Intratumoral Injections of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells in Metastatic Breast Cancer. *Cancer Immunol Res*, 5(12), 1152-1161. doi:10.1158/2326-6066.cir-17-0189
- Thai, A. A., Solomon, B. J., Sequist, L. V., Gainor, J. F., & Heist, R. S. (2021). Lung cancer. *Lancet*, 398(10299), 535-554. doi:10.1016/s0140-6736(21)00312-3
- Thapa, P., & Farber, D. L. (2019). The Role of the Thymus in the Immune Response. *Thorac Surg Clin*, 29(2), 123-131. doi:10.1016/j.thorsurg.2018.12.001
- Togashi, Y., Shitara, K., & Nishikawa, H. (2019). Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 16(6), 356-371. doi:10.1038/s41571-019-0175-7
- Tong, C., Zhang, Y., Liu, Y., Ji, X., Zhang, W., Guo, Y., . . . Han, W. (2020). Optimized tandem CD19/CD20 CAR-engineered T cells in refractory/relapsed B-cell lymphoma. *Blood*, 136(14), 1632-1644. doi:10.1182/blood.2020005278
- Turajlic, S., Litchfield, K., Xu, H., Rosenthal, R., McGranahan, N., Reading, J. L., . . . Swanton, C. (2017). Insertion-and-deletion-derived tumour-specific neoantigens and the immunogenic phenotype: a pan-cancer analysis. *Lancet Oncol*, 18(8), 1009-1021. doi:10.1016/s1470-2045(17)30516-8
- Turtle, C. J., Hanafi, L. A., Berger, C., Gooley, T. A., Cherian, S., Hudecek, M., . . . Maloney, D. G. (2016). CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest*, 126(6), 2123-2138. doi:10.1172/jci85309
- Tyagarajan, S., Spencer, T., & Smith, J. (2020). Optimizing CAR-T Cell Manufacturing Processes during Pivotal Clinical Trials. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 16, 136-144. doi:10.1016/j.omtm.2019.11.018
- Ujvari, B., & Belov, K. (2011). Major Histocompatibility Complex (MHC) markers in conservation biology. *Int J Mol Sci*, 12(8), 5168-5186. doi:10.3390/ijms12085168
- Valentini, D., Rao, M., Meng, Q., von Landenberg, A., Bartek, J., Jr., Sinclair, G., . . . Maeurer, M. (2018). Identification of neoepitopes recognized by tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) from patients with glioma. *Oncotarget*, 9(28), 19469-19480. doi:10.18632/oncotarget.24955
- Vedvyas, Y., McCloskey, J. E., Yang, Y., Min, I. M., Fahey, T. J., Zarnegar, R., . . . Jin, M. M. (2019). Manufacturing and preclinical validation of CAR T cells targeting ICAM-1 for advanced thyroid cancer therapy. *Sci Rep*, 9(1), 10634. doi:10.1038/s41598-019-46938-7

- Vignali, D., & Kallikourdis, M. (2017). Improving homing in T cell therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, *36*, 107-116. doi:10.1016/j.cytogfr.2017.06.009
- Vitale, I., Manic, G., Coussens, L. M., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2019). Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Cell Metab*, *30*(1), 36-50. doi:10.1016/j.cmet.2019.06.001
- Wallstabe, L., Göttlich, C., Nelke, L. C., Kühnemundt, J., Schwarz, T., Nerreter, T., . . . Hudecek, M. (2019). ROR1-CAR T cells are effective against lung and breast cancer in advanced microphysiologic 3D tumor models. *JCI Insight*, *4*(18). doi:10.1172/jci.insight.126345
- Wallstabe, L., Madas, A., Frenz, S., Einsele, H., Rader, C., & Hudecek, M. (2018). CAR T cells targeting  $\alpha(v)\beta(3)$  integrin are effective against advanced cancer in preclinical models. *Adv Cell Gene Ther*, *1*(2). doi:10.1002/acg2.11
- Wang, K., Wei, G., & Liu, D. (2012). CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol*, *1*(1), 36. doi:10.1186/2162-3619-1-36
- Wat, J., & Barmettler, S. (2022). Hypogammaglobulinemia After Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy: Characteristics, Management, and Future Directions. *J Allergy Clin Immunol Pract*, *10*(2), 460-466. doi:10.1016/j.jaip.2021.10.037
- Watanabe, N., Bajgain, P., Sukumaran, S., Ansari, S., Heslop, H. E., Rooney, C. M., . . . Vera, J. F. (2016). Fine-tuning the CAR spacer improves T-cell potency. *Oncoimmunology*, *5*(12), e1253656. doi:10.1080/2162402x.2016.1253656
- Webb, E. S., Liu, P., Baleeiro, R., Lemoine, N. R., Yuan, M., & Wang, Y. H. (2018). Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy. *J Biomed Res*, *32*(5), 317-326. doi:10.7555/jbr.31.20160168
- Wei, X., Lai, Y., Li, J., Qin, L., Xu, Y., Zhao, R., . . . Li, P. (2017). PSCA and MUC1 in non-small-cell lung cancer as targets of chimeric antigen receptor T cells. *Oncoimmunology*, *6*(3), e1284722. doi:10.1080/2162402x.2017.1284722
- Weljie, A. M., & Jirik, F. R. (2011). Hypoxia-induced metabolic shifts in cancer cells: moving beyond the Warburg effect. *Int J Biochem Cell Biol*, *43*(7), 981-989. doi:10.1016/j.biocel.2010.08.009
- Wicks, E. E., & Semenza, G. L. (2022). Hypoxia-inducible factors: cancer progression and clinical translation. *J Clin Invest*, *132*(11). doi:10.1172/jci159839
- Wörn, A., & Plückthun, A. (1999). Different equilibrium stability behavior of ScFv fragments: identification, classification, and improvement by protein engineering. *Biochemistry*, *38*(27), 8739-8750. doi:10.1021/bi9902079
- Wu, D., Lv, J., Zhao, R., Wu, Z., Zheng, D., Shi, J., . . . Yao, Y. (2020). PSCA is a target of chimeric antigen receptor T cells in gastric cancer. *Biomark Res*, *8*, 3. doi:10.1186/s40364-020-0183-x
- Wu, Q., Li, B., Li, Z., Li, J., Sun, S., & Sun, S. (2019). Cancer-associated adipocytes: key players in breast cancer progression. *J Hematol Oncol*, *12*(1), 95. doi:10.1186/s13045-019-0778-6
- Wu, X., Luo, H., Shi, B., Di, S., Sun, R., Su, J., . . . Li, Z. (2019). Combined Antitumor Effects of Sorafenib and GPC3-CAR T Cells in Mouse Models of Hepatocellular Carcinoma. *Mol Ther*, *27*(8), 1483-1494. doi:10.1016/j.ymthe.2019.04.020
- Xie, Y. J., Dougan, M., Ingram, J. R., Pishesha, N., Fang, T., Momin, N., & Ploegh, H. L. (2020). Improved Antitumor Efficacy of Chimeric Antigen Receptor T Cells that Secrete Single-Domain Antibody Fragments. *Cancer Immunol Res*, *8*(4), 518-529. doi:10.1158/2326-6066.cir-19-0734
- Xie, Y. J., Dougan, M., Jailkhani, N., Ingram, J., Fang, T., Kummer, L., . . . Ploegh, H. (2019). Nanobody-based CAR T cells that target the tumor microenvironment inhibit the growth of solid tumors in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *116*(16), 7624-7631. doi:10.1073/pnas.1817147116

- Xiong, W., Chen, Y., Kang, X., Chen, Z., Zheng, P., Hsu, Y. H., . . . Liu, D. (2018). Immunological Synapse Predicts Effectiveness of Chimeric Antigen Receptor Cells. *Mol Ther*, *26*(4), 963-975. doi:10.1016/j.ymthe.2018.01.020
- Xu, J., Meng, Q., Sun, H., Zhang, X., Yun, J., Li, B., . . . Chen, R. (2021). HER2-specific chimeric antigen receptor-T cells for targeted therapy of metastatic colorectal cancer. *Cell Death Dis*, *12*(12), 1109. doi:10.1038/s41419-021-04100-0
- Xu, X., Sun, Q., Liang, X., Chen, Z., Zhang, X., Zhou, X., . . . Li, Y. (2019). Mechanisms of Relapse After CD19 CAR T-Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Prevention and Treatment Strategies. *Front Immunol*, *10*, 2664. doi:10.3389/fimmu.2019.02664
- Xu, X., Zhao, W., Yue, Z., Qin, M., Jin, M., Chang, L. J., & Ma, X. (2020). 4SCAR-GD2-modified T-cell therapy in neuroblastoma with MYCN amplification: A case report with over 4-year follow-up data. *Pediatr Investig*, *4*(1), 55-58. doi:10.1002/ped4.12181
- Xue, L., Yi, Y., Xu, Q., Wang, L., Yang, X., Zhang, Y., . . . Wang, X. (2021). Chimeric antigen receptor T cells self-neutralizing IL6 storm in patients with hematologic malignancy. *Cell Discov*, *7*(1), 84. doi:10.1038/s41421-021-00299-6
- Yang, J., Yan, J., & Liu, B. (2017). Targeting EGFRvIII for glioblastoma multiforme. *Cancer Lett*, *403*, 224-230. doi:10.1016/j.canlet.2017.06.024
- Yang, J., Yan, J., & Liu, B. (2018). Targeting VEGF/VEGFR to Modulate Antitumor Immunity. *Front Immunol*, *9*, 978. doi:10.3389/fimmu.2018.00978
- Yang, Y., Jacoby, E., & Fry, T. J. (2015). Challenges and opportunities of allogeneic donor-derived CAR T cells. *Curr Opin Hematol*, *22*(6), 509-515. doi:10.1097/moh.0000000000000181
- Yang, Y. H., Liu, J. W., Lu, C., & Wei, J. F. (2022). CAR-T Cell Therapy for Breast Cancer: From Basic Research to Clinical Application. *Int J Biol Sci*, *18*(6), 2609-2626. doi:10.7150/ijbs.70120
- Ying, Z., He, T., Wang, X., Zheng, W., Lin, N., Tu, M., . . . Zhu, J. (2019). Parallel Comparison of 4-1BB or CD28 Co-stimulated CD19-Targeted CAR-T Cells for B Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Mol Ther Oncolytics*, *15*, 60-68. doi:10.1016/j.omto.2019.08.002
- Yu, H., Pan, J., Guo, Z., Yang, C., & Mao, L. (2019). CART cell therapy for prostate cancer: status and promise. *Onco Targets Ther*, *12*, 391-395. doi:10.2147/ott.s185556
- Yuen, G. J., Demissie, E., & Pillai, S. (2016). B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship. *Trends Cancer*, *2*(12), 747-757. doi:10.1016/j.trecan.2016.10.010
- Yusakul, G., Sakamoto, S., Pongkitwitoon, B., Tanaka, H., & Morimoto, S. (2016). Effect of linker length between variable domains of single chain variable fragment antibody against daidzin on its reactivity. *Biosci Biotechnol Biochem*, *80*(7), 1306-1312. doi:10.1080/09168451.2016.1156482
- Zahid, A., Siegler, E. L., & Kenderian, S. S. (2020). CART Cell Toxicities: New Insight into Mechanisms and Management. *Clin Hematol Int*, *2*(4), 149-155. doi:10.2991/chi.k.201108.001
- Zareie, P., Farenc, C., & La Gruta, N. L. (2020). MHC Restriction: Where Are We Now? *Viral Immunol*, *33*(3), 179-187. doi:10.1089/vim.2019.0195
- Zarogoulidis, P., Darwiche, K., Sakkas, A., Yarmus, L., Huang, H., Li, Q., . . . Malecki, M. (2013). Suicide Gene Therapy for Cancer - Current Strategies. *J Genet Syndr Gene Ther*, *4*. doi:10.4172/2157-7412.1000139
- Zboralski, D., Hoehlig, K., Eulberg, D., Frömming, A., & Vater, A. (2017). Increasing Tumor-Infiltrating T Cells through Inhibition of CXCL12 with NOX-A12 Synergizes with PD-1 Blockade. *Cancer Immunol Res*, *5*(11), 950-956. doi:10.1158/2326-6066.cir-16-0303
- Zeng, J., Zhang, J., Yang, Y. Z., Wang, F., Jiang, H., Chen, H. D., . . . Hu, W. M. (2020). IL13RA2 is overexpressed in malignant gliomas and related to clinical outcome of patients. *Am J Transl Res*, *12*(8), 4702-4714.

- Zhang, C., Liu, J., Zhong, J. F., & Zhang, X. (2017). Engineering CAR-T cells. *Biomark Res*, 5, 22. doi:10.1186/s40364-017-0102-y
- Zhang, C., Wang, Z., Yang, Z., Wang, M., Li, S., Li, Y., . . . Qian, C. (2017). Phase I Escalating-Dose Trial of CAR-T Therapy Targeting CEA(+) Metastatic Colorectal Cancers. *Mol Ther*, 25(5), 1248-1258. doi:10.1016/j.ymthe.2017.03.010
- Zhang, L., Tian, L., Dai, X., Yu, H., Wang, J., Lei, A., . . . Zhang, J. (2020). Pluripotent stem cell-derived CAR-macrophage cells with antigen-dependent anti-cancer cell functions. *J Hematol Oncol*, 13(1), 153. doi:10.1186/s13045-020-00983-2
- Zhang, S., Chen, L., Wang-Rodriguez, J., Zhang, L., Cui, B., Frankel, W., . . . Kipps, T. J. (2012). The onco-embryonic antigen ROR1 is expressed by a variety of human cancers. *Am J Pathol*, 181(6), 1903-1910. doi:10.1016/j.ajpath.2012.08.024
- Zhang, Y., & Ertl, H. C. (2016). Depletion of FAP+ cells reduces immunosuppressive cells and improves metabolism and functions CD8+T cells within tumors. *Oncotarget*, 7(17), 23282-23299. doi:10.18632/oncotarget.7818
- Zhang, Z., Jiang, D., Yang, H., He, Z., Liu, X., Qin, W., . . . Qian, Q. (2019). Modified CAR T cells targeting membrane-proximal epitope of mesothelin enhances the antitumor function against large solid tumor. *Cell Death Dis*, 10(7), 476. doi:10.1038/s41419-019-1711-1
- Zhen, A., Kamata, M., Rezek, V., Rick, J., Levin, B., Kasparian, S., . . . Kitchen, S. G. (2015). HIV-specific Immunity Derived From Chimeric Antigen Receptor-engineered Stem Cells. *Mol Ther*, 23(8), 1358-1367. doi:10.1038/mt.2015.102
- Zheng, G., Lyons, J. G., Tan, T. K., Wang, Y., Hsu, T. T., Min, D., . . . Harris, D. C. (2009). Disruption of E-cadherin by matrix metalloproteinase directly mediates epithelial-mesenchymal transition downstream of transforming growth factor-beta1 in renal tubular epithelial cells. *Am J Pathol*, 175(2), 580-591. doi:10.2353/ajpath.2009.080983
- Zhong, S., Cui, Y., Liu, Q., & Chen, S. (2020). CAR-T cell therapy for lung cancer: a promising but challenging future. *J Thorac Dis*, 12(8), 4516-4521. doi:10.21037/jtd.2020.03.118
- Zhou, J., Jin, L., Wang, F., Zhang, Y., Liu, B., & Zhao, T. (2019). Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells expanded with IL-7/IL-15 mediate superior antitumor effects. *Protein Cell*, 10(10), 764-769. doi:10.1007/s13238-019-0643-y
- Zhou, W. T., & Jin, W. L. (2021). B7-H3/CD276: An Emerging Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*, 12, 701006. doi:10.3389/fimmu.2021.701006
- Ziello, J. E., Jovin, I. S., & Huang, Y. (2007). Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med*, 80(2), 51-60.
- Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2012). Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*, 1(8), 1223-1225. doi:10.4161/onci.21335
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., & Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol*, 72(12), 9873-9880. doi:10.1128/jvi.72.12.9873-9880.1998