

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**MONITOROVÁNÍ POPULACE CAR-T
LYMFOCYTŮ BĚHEM LÉČBY KREVNÍCH
MALIGNIT**

**Bc. LENKA DVOŘÁKOVÁ
Vedoucí diplomové práce: RNDr. ONDŘEJ SOUČEK, Ph.D.
HRADEC KRÁLOVÉ, 2023**

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu své práce panu RNDr. Ondřeji Součkovi, Ph.D. za odborné vedení této diplomové práce, cenné rady a trpělivost při řešení dané problematiky a také za pomoc a čas, který mi při realizaci práce poskytl. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svému příteli a rodině, kteří mě velmi podporovali po celou dobu mého studia.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 23.4.2023

.....
Lenka Dvořáková

Obsah

1. OBSAH

1. Obsah.....	4
2. ABSTRAKT.....	6
3. ABSTRACT.....	7
4. ÚVOD.....	8
5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE.....	9
6. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
6.1 Hematologické malignity.....	10
6.1.1 Diagnostika.....	10
6.1.2 Léčba.....	11
6.1.4 Epidemiologie.....	15
6.2 CAR-T lymfocyty.....	17
6.2.1 Historie.....	17
6.2.2 Chimérický antigenní receptor.....	19
6.2.3 Příprava (výroba) CAR-T lymfocytů.....	24
6.2.4 Podání CAR-T lymfocytů.....	27
6.2.5 Rozmrazení a převod CAR-T lymfocytů.....	28
6.3 Klinické využití.....	29
6.3.1 ALL.....	30
6.3.2 CLL.....	31
6.3.3 NHL.....	33
6.3.4 MM.....	34
6.3.5 Solidní nádory.....	34
6.3.6 Aktuální využití v ČR.....	35
6.4 Nežádoucí účinky a komplikace.....	37
6.4.1 Syndrom uvolnění cytokinů.....	37
6.4.2 Neurologická toxicita.....	38
6.4.3 B lymfocytární aplazie.....	39
6.4.4 Další nežádoucí účinky a komplikace.....	39
6.5 Průtoková cytometrie.....	40

6.5.1 Průtoková cytometrie v klinické hematologii.....	40
7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	42
7.1 Charakteristika sledovaného souboru.....	42
7.2 Metodika.....	43
7.2.1 Zpracování vzorku.....	43
7.2.2 Metodika zpracování dat.....	43
8. VÝSLEDKY.....	45
8.1 Dynamika expanze CAR-T lymfocytů.....	45
8.2 Pacient č. 1.....	47
8.3 Pacient č. 2.....	49
8.4 Pacient č. 3.....	51
8.5 Pacient č. 4.....	53
8.6 Pacient č. 5.....	55
8.7 Pacient č. 6.....	58
8.8 Pacient č. 7.....	60
8.9 CAR-T lymfocyty v čase u všech pacientů.....	62
8.10 Výtěžek CD3+ lymfocytů z aferézy.....	66
9. DISKUSE.....	68
10. ZÁVĚR.....	72
11. POUŽITÉ ZKRATKY.....	73
12. SEZNAM TABULEK.....	75
13. SEZNAM OBRÁZKŮ.....	76
14. SEZNAM GRAFŮ.....	77
15. POUŽITÁ LEITERATURA.....	78

2. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra	biologických a lékařských věd
Autor	Bc. Lenka Dvořáková
Vedoucí	RNDr. Ondřej Souček, Ph.D.
Název diplomové práce	Monitorování populace CAR-T lymfocytů během léčby krevních malignit

Diplomová práce se zabývá terapií T lymfocytů s chimérickým antigenním receptorem (CAR) u léčby krevních malignit. Konkrétně se zaměřuje na monitorování populace CAR-T lymfocytů u pacientů v čase, po podání léčebného přípravku. Měření bylo prováděno ze vzorků plné krve měřením na průtokovém cytometru. Teoretická část je věnována hematologickým malignitám: jejich diagnostice a léčbě, dále CAR-T lymfocytům: historii, výrobě, klinickému využití, nežádoucím účinkům a stanovením. Experimentální část je potom věnována zpracování naměřených výsledků.

Cílem diplomové práce bylo zpracovat odbornou rešerši o daném tématu a vyhodnotit výsledky sledování populace CAR-T lymfocytů v čase.

Provedenou technikou se podařilo prokázat CAR-T lymfocyty v krvi u všech pacientů, průtoková cytometrie s využitím zkumavky od firmy Exbio a použitím protilátky antiFMC63 scFv od firmy Acro Biosystems se jeví jako vhodná metoda. Míra expanze CAR-T lymfocytů byla u jednotlivých pacientů individuální. U dvou pacientek byly CAR-T lymfocyty detekovány ještě rok od podání přípravku. U pacientů byly hojně pozorovány nežádoucí účinky CRS a ICANS, které ovšem nesouvisely s mírou expanze CAR-T lymfocytů ani s výtěžkem CD3+ lymfocytů z aferézy.

Klíčová slova: CAR-T lymfocyty, hematologické malignity, průtoková cytometrie, imunoterapie

3. ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Author Bc. Lenka Dvořáková

Supervisor RNDr. Ondřej Souček, Ph.D.

Title of Thesis Monitoring of CAR-T lymphocytes in the course of hemato-oncological therapy

The diploma thesis deals with the therapy of T cells with a chimeric antigen receptor (CAR) in the treatment of blood malignancies. Specifically, it focuses on monitoring the population of CAR-T cells in patients over time, after the administration of a therapeutic product. Measurements were made from whole blood samples by measurement on a flow cytometer. The theoretical part is devoted to hematological malignancies: their diagnosis and treatment, as well as to CAR-T cells: history, production, clinical use, side effects and determinations. The experimental part is dedicated to processing of the measured results.

The goal of the thesis was to prepare a research on the given topic and evaluate the results of monitoring the population of CAR-T cells over time.

The performed technique was able to demonstrate CAR-T cells in the blood of all patients, flow cytometry using a test tube from the company Exbio and using the antiFMC63 scFv antibody from the company Acro Biosystems appears to be a suitable method. The rate of expansion of CAR-T cells was individual for each patient. In two patients, CAR-T cells were still detected a year after administration of the product. Adverse effects of CRS and ICANS were widely observed in patients, which, however, did not correlate with the degree of expansion of CAR-T cells or with the yield of CD3+ cells from apheresis.

Key words: CAR-T cells, hematological malignancies, flow cytometry, immunotherapy

4. ÚVOD

Ve své diplomové práci jsem se zabývala problematikou onkologických malignit, které představují závažný zdravotní problémem. Práce je členěna na teoretickou a praktickou část.

Konkrétně jsem se věnovala hematologickým malignitám. Postihují všechny věkové kategorie a pohlaví. I přes mnohé studie není příčina vzniku onemocnění zcela objasněna, k rozvoji choroby mohou přispívat různé faktory, například genetické faktory, faktory životního prostředí a také samotná životospráva konkrétního jedince. Jedná se tedy o onemocnění s multifaktoriální etiologií.

Klasická terapie je založena zejména na nespecifických metodách jako jsou radioterapie a chemoterapie. Hematologická onkologie dosáhla v posledních letech velkého rozvoje a pokroku. Trendem moderní léčby je vyvíjet cílené terapie, kdy je specificky cíleno pouze na nádorové buňky a zdravé buňky nejsou poškozeny vůbec nebo pouze v malém rozsahu. Dále je kladen důraz na personalizaci léčby konkrétnímu pacientovi. Mezi tyto moderní směry patří také terapie pomocí CAR-T lymfocytů.

CAR-T lymfocyty jsou geneticky upravené lymfocyty pacienta, jedná se tedy o buněčnou imunoterapii. Cílem této léčby je aktivovat vlastní imunitní systém v boji proti nádorovému onemocnění. Účinnost této terapie byla ověřena mnoha studiemi a je slibnou budoucností pro léčbu široké škály onkologických onemocnění.

Terapie CAR-T lymfocyty je v ČR dostupná od roku 2018, kdy proběhla i první léčba touto terapií v ČR. Momentálně je na trhu dostupných šest schválených preparátů, z toho tři v ČR.

5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo monitorovat populaci CAR-T lymfocytů v čase u pacientů léčených preparáty CAR-T lymfocytů. Dalším cílem bylo také otestovat vhodnost zkumavky od firmy Exbio pro stanovení subpopulací lymfocytů a protilátky antiFMC63 scFv od firmy Acro Biosystems pro stanovení CAR-T lymfocytů na průtokovém cytometru. Dílčím cílem bylo zhodnotit CAR-T lymfocyty v souvislosti s nežádoucími účinky a výtěžkem CD3+ lymfocytů z aferézy. Cílem teoretické části práce bylo shromáždit a zpracovat dostupné informace o hematologických malignitách, jejich diagnostice a léčbě, a dále podat informace o CAR-T lymfocytech, jejich historii, výrobě, klinickému využití a nežádoucích účincích.

6. TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Hematologické malignity

Hematologické malignity jsou zhoubné nádory klonálně vznikající v krvetvorné tkáni nebo v buňkách imunitního systému. Klonální vývoj je vícestupňový proces, při kterém dochází ke změně genetické výbavy v jedné buňce, pro kterou to představuje růstovou výhodu. „V dceřiných buňkách je tato odchylka opakována a tím vznikne populace nádorových elementů, které díky svým růstovým vlastnostem utlačují normální krvetvorbu“. (Doležalová, 2016)

Hematologické malignity lze dělit na myeloidní a lymfoidní nemoci. „Myeloidní onemocnění vzniká na podkladu z pluripotentní kmenové buňky, která je už nasměrována pro vývoj myeloidních buněk (erytrocyty, trombocyty, monocyty, neutrofilů, eozinofilů a bazofilů)“ (Penka et al., 2011). Nádory lymfoidního charakteru vznikají z buňky progenitorové z lymfatické řady nebo více zralých lymfatických buněk (Penka et al., 2011). Onemocnění dále rozdělujeme podle průběhu na akutní a chronické. U akutního onemocnění dochází k rychlému rozvoji a při neléčení může nastat smrt velmi rychle, obvykle v týdnech až měsících. Morfologicky zde nalézáme nezralé buňky – blasty. U chronických onemocnění dochází k plíživému projevu nemoci a u nemocného dochází k přežití v řádech měsíců až roků. Morfologicky zde nalézáme zralé buňky. (Penka et al., 2011)

Velmi základně můžeme hematologické malignity dělit na: leukémie, lymfomy a mnohočetný myelom (MM). Jako lymfom označujeme nádorové onemocnění, které začíná v lymfatickém systému. MM je nádorové onemocnění vznikající v kostní dřeni, postihující plazmatické buňky. Leukémie je nádorové onemocnění, které začíná v kostní dřeni nebo krvi. (Penka et al., 2011)

6.1.1 Diagnostika

Pro zjištění správné diagnózy je potřebné znát informace o morfologii, buněčném fenotypu a cytogenetické a molekulárně genetické vlastnosti. Všechny tyto informace získáváme pomocí mnoha testů, které se v posledních letech stále vyvíjejí a tím klesá i jejich finanční nákladnost, která je ale stále dost vysoká. (Erber, 2010)

Jednou z nejzákladnějších diagnostických metod je vyšetření morfologie hematologických buněk. V klinické praxi se běžně používá a je velmi důležité. V nejzákladnějším uspořádání vyšetření provádí zdravotní laborant pomocí světelného mikroskopu z nátěru krve a kostní dřeně, nátěr je obarven Pappenheimovým panoptickým barvením. V dnešní době jsou často využívány různé automatizované způsoby stanovení, například automatická digitální morfologie pro analýzu krevních nátěrů. Morfologické vyšetření často slouží k prvozáchytu onemocnění. Mezi další využívané metody, které jsou ale již pokročilejší, patří například metody molekulární genetiky, cytogenetika, průtoková cytometrie a imunochemické vyšetření. (Doubek, 2013)

6.1.2 Léčba

Po správném stanovení diagnózy následuje určení způsobu léčby onemocnění. Vhodně zvolená terapie se určuje podle několika kritérií, záleží na typu onemocnění, stupni progresu a také na věku a celkovém zdravotním stavu pacienta. Při onkologické léčbě dochází ke kombinování několika postupů, jedná se o multimodální terapii. Mezi tyto postupy patří: chirurgická léčba, chemoterapie, radioterapie, hormonální léčba, imunoterapie a biologická léčba (cílená). Terapii také můžeme rozlišovat na kauzální (symptomatickou), kdy se neléčí příčina nemoci, ale pouze symptomy a na terapii kurativní, kdy je cílem úplné vyléčení malignity. (Doubek, 2013)

6.1.2.1 Chemoterapie

Chemoterapie je zatím nejdůležitějším způsobem terapie hematologických malignit. Jedná se o metodu, kdy jsou do organismu vpravovány chemické látky, konkrétně cytostatika. Cílem je zasáhnout buněčný cyklus nádorové buňky a zabránit jí v dalším dělení. Léčba těmito látkami není přesně cílená, proto cytostatika zasahují i zdravé buňky. Chemoterapie je často podávána v cyklech s třítýdenními pauzami, aby měl organismus čas na regeneraci. Délka léčby je velmi různá v závislosti na mnoha faktorech. K podání léčiva nejčastěji dochází pomocí nitrožilní infuze, dále lze léky podávat i pomocí tablet. (Adam, 2004)

Princip fungování cytostatik spočívá v tom, že působí na buňky ve stádiu mitózy, primárně tedy účinkují na rychle se množící nádorové buňky, zdravá tkáň má mitotickou aktivitu výrazně nižší, proto na ně cytostatika působí méně. Opravné

mechanismy nádorových buněk většinou nefungují správně, proto je šance na opravu minimální na rozdíl od buněk zdravých. Ne všechny nádory ovšem reagují na chemoterapii, takové se označují za chemorezistentní. (Adam, 2004)

6.1.2.2 Chirurgická léčba

Chirurgické metody léčby se uplatňují pouze u solidních nádorů, a to jak v diagnostice, tak i v léčbě a při řešení dalších komplikací spojených s onemocněním. V časných stádiích nádoru slouží jako základ terapie. U onemocnění, které již pokročilo, pouze chirurgická léčba nestačí a je součástí komplexní péče. (Adam et al., 2011)

Chirurgické výkony můžeme rozdělit do několika následujících skupin:

- Diagnostické výkony, odběr materiálu k histologickému vyšetření a k ověření klinického stádia patologicky
- Profylaktické operace
- Kurativní léčebné výkony u pacientů, jejichž nádor není pokročilého stavu
- Operační výkony u pacientů s pokročilými nádory, s další komplexní léčbou mohou prodloužit pacientův život, nebo dokonce onemocnění vyléčit
- Paliativní chirurgické výkony, které slouží ke zkvalitnění života

(Adam et al., 2011)

6.1.2.3 Radioterapie

Radioterapie se řadí mezi základní metody léčby zhoubných onemocnění, terapii podstupuje až 50-70 % onkologických pacientů. Při léčbě se používá především elektronové a elektromagnetické záření. Radioterapii lze základně rozdělit podle místa zdroje záření na zevní radioterapii a brachyradioterapii, u které je zdroj záření zaveden přímo k ložisku nádoru (Adam et al., 2011). Principem terapie je vyvolání dvou vláknových zlomů DNA. Toho lze docílit buď přímým nebo nepřímým mechanismem. U přímého způsobu dochází k předání energie přímo molekule DNA, zatímco u nepřímého mechanismu je energie předána jiné molekule, vznikají volné radikály a následně dochází k poškození DNA. (DeVita et al., 2022)

Radioterapie u hematologických malignit je využívána v souvislosti s přípravným režimem před transplantací kostní dřeně, provádí se celotělové ozáření. Další léčebné využití má také v počátečních fázích onemocnění, kdy je kombinována s chemoterapií. Radioterapii lze využívat také pro paliativní účely, například při léčbě bolestivých leukemických infiltrátů. (Hynková et al., 2012)

6.1.2.4 Transplantace krvetvorných buněk

Transplantace krvetvorných buněk je v dnešní době běžnou součástí léčby hematologických onemocnění. Léčba se skládá z několika fází. Nejprve dochází k odběru transplantátu, u pacienta probíhá přípravný režim (vysokodávkovaná chemoterapie či chemoradioterapie), potom dochází k převodu transplantátu a následuje potransplantační období. Rozlišujeme transplantace autologní, kdy se pacientovi transplantují vlastní krvetvorné buňky a transplantace alogenní, kdy pacient dostává buňky od dárce. Další dělení můžeme provádět podle zdroje krvetvorných buněk: transplantace kostní dřeně, pupečnickové krve a transplantace periferních kmenových buněk, kdy dnes je tento způsob odběru krvetvorných buněk využíván nejvíce. (Penka, 2011)

6.1.2.5 Cílená léčba v hematoonkologii

Díky pokroku v genetice a molekulární biologii mohlo dojít k rozvoji cílené léčby v onkologii. Jedná se o novější skupinu látek, které působí na konkrétní molekuly a procesy typické pro nádorové buňky, čímž se odlišují od klasických cytostatik, která nepůsobí cíleně. Cílem těchto látek je negativně působit na nádorové buňky na úrovni regulačních a signálních proteinů. Díky tomu dochází ke zvyšování účinku terapie a naopak k snižování rizika vážných nežádoucích účinků. Látky můžeme označit za „intracelulární chemoterapii“. (Kelner, 2011)

6.1.2.6 Imunoterapie

Pod termín imunoterapie můžeme zahrnout všechny léčebné postupy, které využívají složky imunitního systému k indukci, znovuzavedení nebo podpoření protinádorové imunity. Cílem je aktivovat protinádorovou imunitu. Imunoterapii dělíme na humorální a buněčnou. (Hořejší, 2005)

Humorální imunoterapie

Při humorální imunoterapii mohou protilátky sloužit jako nosiče léčiv a toxinů. Dále se využívá jejich fyziologických funkcí, kdy dochází k vazbě protilátky na cílový antigen a následně nastává aktivace různých mechanismů, které vedou ke smrti cílové buňky. Využívají se monoklonální protilátky, což jsou protilátky pocházející z jednoho klonu plazmatické buňky mající jedinečnou specifitu. Jako první se začaly používat myší monoklonální protilátky. V dnešní době už se tento typ protilátky téměř nepoužívá, jelikož představoval riziko pro pacienty v podobě častých imunitních reakcí, dnes se využívají především chimérické a humanizované protilátky. (Reynolds et al., 1989)

Zásadní roli v humorální imunoterapii hrají nádorově specifické protilátky, které se označují jako biologická protinádorová léčba. Tyto protilátky fungují na stejném mechanismu jako fyziologicky vznikající protilátky například při infekci. (Otáhal, 2015) Další využívané protilátky jsou bispecifické a imunomodulační protilátky (Sheridan, 2015). Bispecifické protilátky jsou připravené genetickou modifikací a mají dvě vazebná místa s odlišnou antigenní specifikou, takže jsou schopné vazby na imunitní buňky (zde konkrétně cytotoxické T lymfocyty) a cílové antigeny nádorových buněk současně. Tím je usnadněna aktivace T lymfocytů, které následně zabíjejí nádorové buňky (Offner et al., 2006). Imunomodulační protilátky ovlivňují činnost imunitního systému stimulačně nebo supresivně. Pro stimulaci protinádorové imunity jsou využívány imunostimulační protilátky. Existuje několik odlišných strategií fungování, jednou z možností je inhibice kostimulačních signálů T lymfocytů, například blokadí cytotoxického T lymfocytárního antigenu. Tyto protilátky jsou označovány také jako inhibitory kontrolních bodů. Tento typ protilátek je využíván při léčbě mnohočetného myelomu (Buqué et al., 2015)

Buněčná imunoterapie

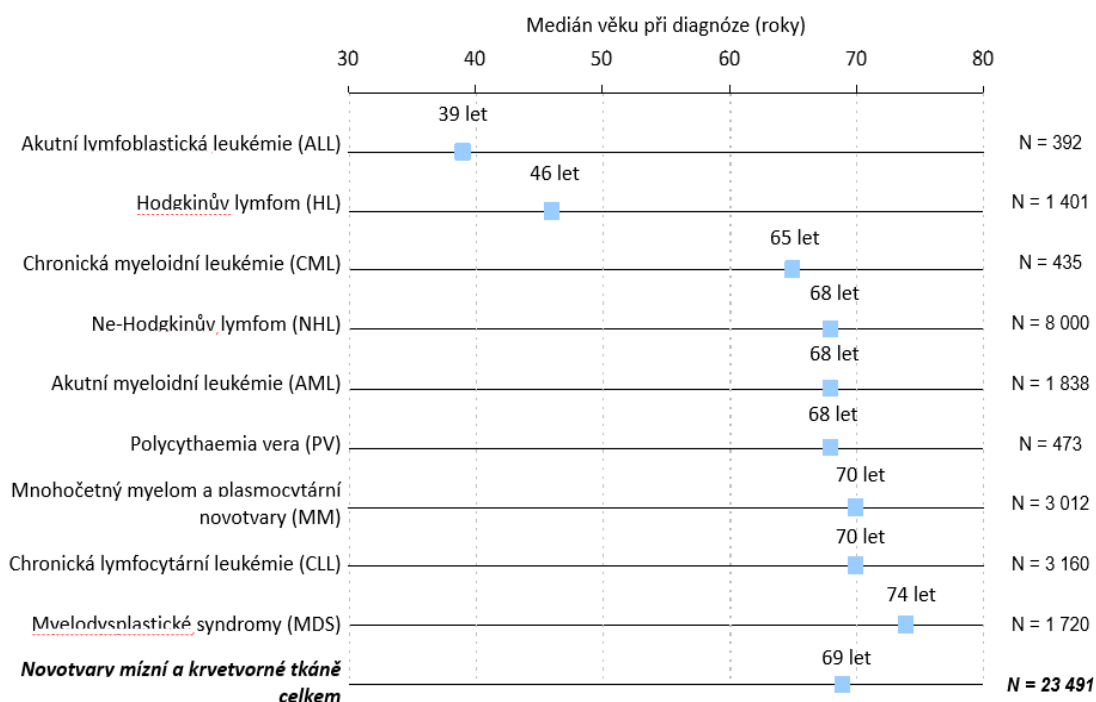
Buněčná imunoterapie využívá přímo buňky imunitního systému. Do této kategorie patří léčba pomocí chimérických antigenních receptorů (CAR, z anglického chimeric antigen receptor) T lymfocytů, protinádorové vakcíny s dendritickými buňkami a také transplantace hematopoetických kmenových buněk. (Otáhal, 2015)

6.1.3 Epidemiologie

Na konci roku 2018 žilo v ČR 36 722 osob, kterým byl diagnostikován hematogenní nebo mízní novotvar, nebo tato onemocnění prodělaly v minulosti. V roce 2018 bylo v ČR nově diagnostikováno 4 675 případů těchto onemocnění, incidence byla 44,0 a stále roste (Koščík & Mayer, 2021). Ve stejném roce došlo k úmrtí 2 067 osob v souvislosti s novotvory mízní a krvetvorné tkáně, mortalita byla 19,5. Přežití osob se mezi jednotlivými diagnózami velmi liší, především přežití pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML), akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), non Hodgkinovým lymfomem (NHL) a MM se v čase stále zlepšuje.

Věk pacientů se v souvislosti s konkrétní diagnózou také liší. Nejmladší pacienti v ČR se potýkají s ALL a Hodgkinovým lymfomem (HL). Naopak nejstarší pacienti se nejčastěji léčí s myelodysplastickým syndromem (MDS), chronickou lymfocytární leukémií (CLL) a MM, přičemž 50 % všech pacientů je ve věku 59-76 let. (Koščík & Mayer, 2021)

Graf 17: věk pacientů s novotvory mízní a krvetvorné tkáně v ČR v letech 2014–2018



Zdroj: Národní hematoonkologický program České republiky, 2021

V poměru s malou rozlohou ČR dochází i tak k docela velké variabilitě v incidenci, prevalenci i mortalitě mezi jednotlivými kraji. Důvod těchto rozdílů zatím nebyl vysvětlen. (Koščík & Mayer, 2021)

6.2 CAR-T lymfocyty

CAR-T lymfocyty jsou řazeny mezi buněčnou personalizovanou imunoterapii, která je využívána především při léčbě hematologických malignit. „CAR-T lymfocyty jsou in vitro modifikované autologní T lymfocyty pacienta, do kterých je vpraven gen pro chimérický antigenní receptor se specifitou proti definovanému povrchovému antigenu nádorové buňky.“ (Hrabovský, 2020). CAR technologie je založena na kombinaci specifity monoklonálních protilátek a cytotoxicitě T lymfocytů. (Sadelain et al., 2013) CAR-T lymfocyty mají schopnost rozpoznávat antigeny i bez molekul hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, z anglického: major histocompatibility complex), což klasické T lymfocyty nedokáží. Tato funkce je velmi důležitá, jelikož na nádorových buňkách často dochází ke snížené expresi MHC I, takže je klasický T buněčný receptor (TCR, z anglického T-cell receptor) nerozpozná a nemůže zahájit imunitní reakci (Lysák, 2015). Po rozpoznání cílového antigenu na tumorové buňce jsou CAR-T lymfocyty aktivovány a následuje výrazná cytotoxická odpověď namířená proti buňkám s tímto antigenem. (Bauer et al., 2018)

6.2.1 Historie

V 60. letech dvacátého století imunolog Jacques Miller objevil funkci brzlíku, před objevem byl brzlík považován za nedůležitý a bezfunkční orgán. V souvislosti s tímto zjištěním později rozdělil lymfocyty na T lymfocyty a B lymfocyty (Anderson, 2016). V roce 1989 vznikl první návrh CAR, objev byl učiněn na izraelském Weizmann institute of Science imunologem Zeligem Eshharem (Gross G, 1989). V roce 1993 byla kultivována první generace CAR-T lymfocytů. Tato generace nebyla ovšem klinicky efektivní. (Eshhar et al., 1993)

Další výzkum vedl ke vzniku druhé generace CAR-T lymfocytů přidáním kostimulační molekuly CD28 do intracelulární domény. V následujících letech vznikaly technologicky modernizovanější generace třetího, čtvrtého a pátého typu. Díky těmto změnám docházelo ke zvýšení proliferace, odolnosti proti apoptóze a také zvýšené sekreci cytokinů. Následovala řada klinických výzkumů (Subklewe et al., 2019). Prvním větším úspěchem bylo podání CAR-T lymfocytů v roce 2012 sedmileté pacientce Emily Whitehead s diagnostikovanou B-ALL a byla tak prvním dítětem, které

tuto léčbu podstoupilo. Po této léčbě pacientka vykazovala kompletní remisi. (Styczyński, 2020)

V roce 2017 byl americkou institucí Food and Drug Administration schválen první komerční preparát CAR-T lymfocytů ke klinickému použití, Kymriah. O několik měsíců později byl schválen preparát Yescarta. Oba preparáty prokázaly úspěch. Počet pacientů s úplnou remisí stoupal a docházelo i k prodloužení celkového přežití. V srpnu roku 2018 se oba preparáty dostaly také do zemí Evropské unie a v září roku 2019 proběhla léčba prvního pacienta v ČR. (Hrabovský, 2020)

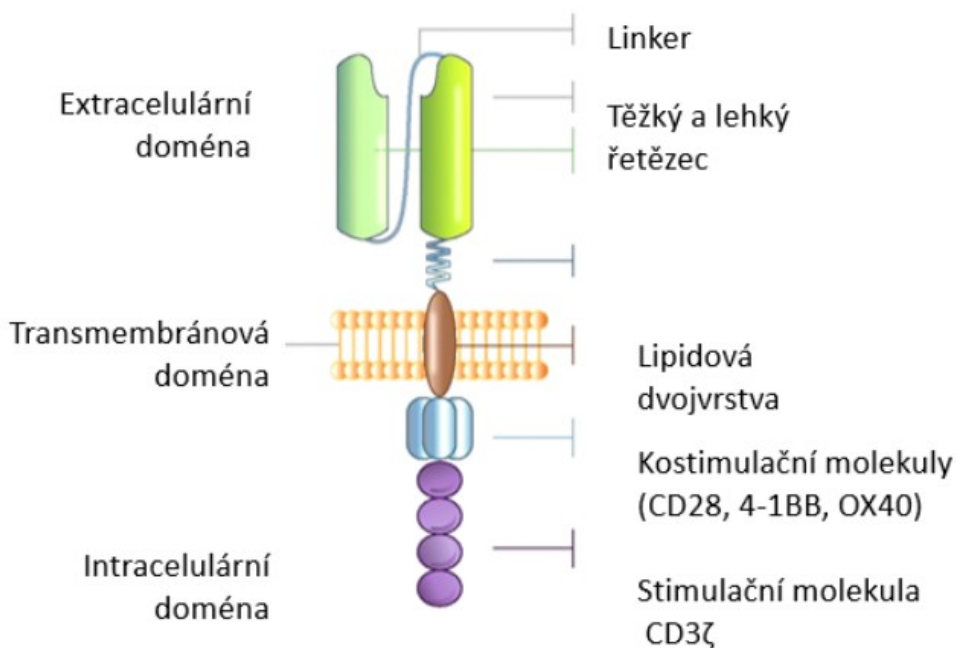
6.2.2 Chimérický antigenní receptor

CAR jsou uměle, geneticky vytvořené receptory, které se nacházejí na povrchu T lymfocytů, díky kterým jsou T lymfocyty schopné cíleně útočit proti specifickým antigenům, které se nachází na maligních buňkách. (Sadelain et al., 2013)

6.2.2.1 Struktura

Základní strukturu CAR antigenu tvoří tři základní domény: extracelulární doména, která má schopnost se specificky vázat na cílový antigen, transmembránová doména, která slouží k přenosu signálu, a intracelulární signální doména, která aktivuje T lymfocyty a spouští imunitní odpověď. (Ahmad, 2022)

Obrázek 1: domény CAR-T lymfocytů



Zdroj: převzato, KUCHAROVÁ, Karina. CAR T buněčná imunoterapie. Ústí nad Labem, 2021. bakalářská práce (Bc.). UNIVERZITA JANA EVANGELISTY PURKYNĚ V ÚSTÍ NAD LABEM. Přírodovědecká fakulta

Extracelulární doména

Extracelulární doména zajišťuje vazbu na cílový antigen a je tvořena jednořetězcovým variabilním fragmentem (scFv, single-chain variable fragment). Jedná se o fúzní protein, který se skládá z linkeru, variabilní části těžkého řetězce (V_H) a variabilní části lehkého řetězce (V_L) monoklonální protilátky, která je specifická k danému antigenu.

Linker je krátký peptidový řetězec, který spojuje V_H a V_L (Sterner, 2021). Nejčastěji využívaná extracelulární doménová složka CD19 CAR-T lymfocytů je FMC63 scFv (Creative Biolabs.com).

Afinita scFv je klíčový parametr který zlepšuje specifitu CAR a také snižuje vedlejší účinky. Je definována jako síla interakce mezi scFv a nádorovým antigenem. CAR mají na rozdíl od klasických TCR mnohem větší rozmezí afinity a specifity. Afinita u CAR je nezávislá na MHC. Snížení afinity zlepšuje specifitu CAR-T lymfocytů, ale v některých případech může snížit i protinádorovou účinnost, zvýšená afinita může vést ke zvýšení nežádoucích účinků (jako je například neurotoxicita). (Jayaraman, 2020)

Další důležitou doménou je spacer, který spojuje transmembránovou a extracelulární část. Díky spaceru je scFv flexibilnější a také pomáhá zlepšit účinnost. Změna délky spaceru může ovlivnit cytolytickou aktivitu a signalizaci CAR-T lymfocytů. V klinicky schválených CAR-T preparátech jsou spacery na bázi IgG protilátek s molekulou CD8 anebo CD28. (Jayaraman, 2020)

Transmembránová doména

Transmembránovou doménu tvoří zejména dvoušroubovice α helixu. Prochází fosfolipidovou dvojvrstvou a je tak důležitá pro stabilitu celé struktury, ukotvuje celý receptor v membráně. Nejčastěji je transmembránová doména tvořena molekulami CD28 a CD8. (Sterner, 2021)

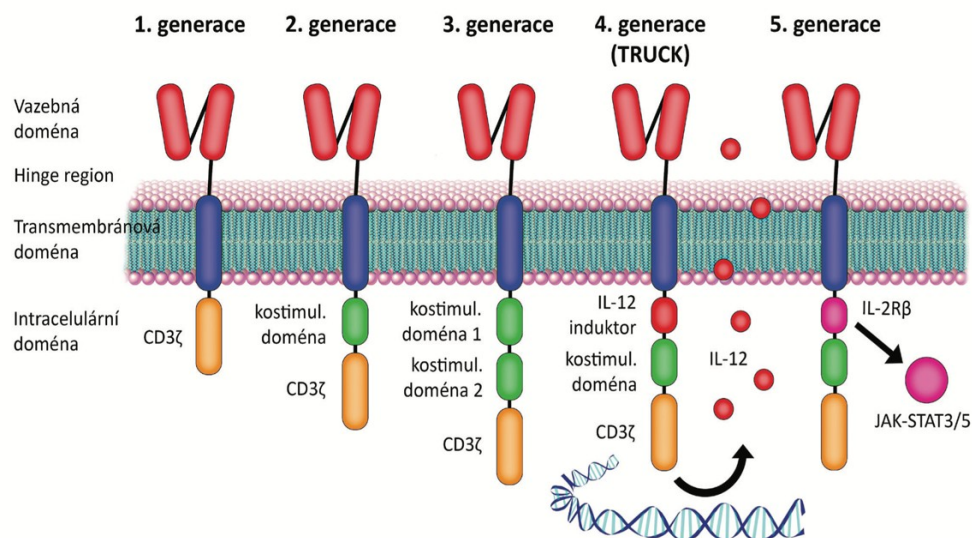
Intracelulární doména

Do intracelulární domény CARu je přenášen signál po rozpoznání antigenu. Základ je tvořen CD3 ζ doménou. Jelikož má řetězec ζ (zeta) krátkou extracelulární doménu, umožňuje tak snadné připojení protilátky na rozdíl od jiných řetězců z CD3 komplexu (Eshhar et al., 1993). CD3 ζ je složen ze tří sekvencí aminokyselin zvaných imunoreceptor tyrosin-based activation motif (ITAM), které jsou důležité pro přenos signálu v imunitních buňkách. ITAM signalizace je například nutná pro diferenciaci a správnou funkci T a B lymfocytů (Humphrey et al., 2005). Ne vždy je doména CD3 ζ dostačující pro kompletní aktivaci T lymfocytů, proto jsou přidávány kostimulační receptory, kterých může být i více, od čehož se odvíjel vznik nových a efektivnějších generací CAR (viz. níže). (Hombach & Abken, 2011)

6.2.2.2 Generace CAR

V dnešní době je známo již pět generací CAR-T lymfocytů, jednotlivé generace se od sebe liší strukturou intracelulární domény, konkrétně povahou a počtem kostimulačních domén (viz obrázek č.2).

Obrázek 2: generace CAR



Zdroj: převzato, <https://www.klinikafarmakologie.cz/pdfs/far/2021/03/02.pdf> (Folber et al., 2021)

První generace

První generace CAR se vyznačuje přítomností řetězce scFv z monoklonální protilátky, transmembránovou částí a signální doménou CD3 ζ z TCR. Tato generace neobsahuje žádnou kostimulační doménu, takže funkce signalizace závisí pouze na molekule CD3 ζ , díky čemuž tato generace nebyla příliš úspěšná, vykazovala nedostatek proliferace a perzistence. (Jayaraman et al., 2020)

Na počátku vývoje CAR-T lymfocytů se využívaly nejdříve jiné signální domény, například řetězec γ (Fc ϵ R γ), což se ukázalo jako velmi neúčinné a až na základě tohoto zjištění se začaly jako signální domény používat CD3 ζ . V současnosti se tato generace již nevyužívá. (Sadelain et al., 2009)

Druhá generace

Druhá generace CAR-T lymfocytů obsahuje navíc kostimulační doménu. První konstrukt CAR-T lymfocytů druhé generace vytvořil britský imunolog John Maher se svými spolupracovníky, když přidali navíc kostimulační doménu CD28. CD28 se vyskytuje i v naivních T lymfocytech, kde plní taktéž kostimulační funkci a TCR bez této molekuly nefunguje správně. Díky tomuto kroku došlo ke zvýšení produkce cytokinů. (Maher et al., 2002)

Další kostimulační doména, která se u druhé generace CAR-T lymfocytů často využívá místo již zmíněné CD28, je protein 4-1BB z rodiny tumor nekrotizujících faktorů (TNF), který je známý také jako CD137 (Jayaraman et al., 2020). Existuje mnoho výzkumů které jednotlivé kostimulační domény porovnávají. Například ve studii z roku 2019 (Ying et al., 2019) bylo zjištěno, že při použití molekuly 4-1BB dochází k delší perzistenci CAR-T lymfocytů v krvi, což zapříčiňuje dlouhodobější terapeutický účinek, ale oproti tomu studie také poukazuje na rychlejší aktivaci T lymfocytů při použití CAR-T lymfocytů s molekulou CD28. (Ying et al., 2019)

Třetí generace

Třetí generace CAR-T lymfocytů obsahuje navíc druhou kostimulační doménu. Nejčastěji se využívají kombinace CD28 a 4-1BB, dále je také často používána molekula OX-40 (známá jako CD134). (Jayaraman et al., 2020).

Proběhlo už mnoho srovnávacích studií ve snaze zjistit, zda má třetí generace lepší vlastnosti, než generace druhá. Například autoři Ramos et al., 2018 ve své in vivo studii porovnávali CD19 specifické CAR-T lymfocyty druhé generace s kostimulační doménou CD28 s třetí generací s doménami CD28 a 4-1BB. Studie ukázala, že CAR-T lymfocyty třetí generace mají až 40x větší expanzi a delší perzistenci buněk než buňky druhé generace. Studie se zaměřovala na pacienty s B-NHL, ALL a také CLL (Ramos et al., 2018). Další in vivo studie prováděná autory Zhao et al. porovnává CAR druhé generace – kostimulační doména CD28 při použití ligandu 4-1BB a třetí generaci s použitím CD28 i 4-1BB. Výsledek přinesl zjištění, že lépe fungovaly buňky druhé generace s ligandem. Tato skutečnost naznačuje, že funkce CAR-T lymfocytů záleží jak na prostorové konfiguraci kostimulačních modulů, tak na jejich typu. (Zhao et al., 2015)

Jasný závěr o prokazatelné klinické účinnosti třetí generace CAR-T lymfocytů nelze vyvodit, jelikož dostupné informace jsou získávány z malého a heterogenního souboru pacientů.

Čtvrtá generace

Čtvrtá generace CAR-T lymfocytů je také nazývána TRUCK (z anglického: T cell redirected for universal cytokine-mediated killing), jejich konstrukt vychází z druhé generace. Tento typ CAR-T lymfocytů má schopnost produkce cytokinů, jako je například interleukin 12 (IL-12), který reguluje zánětlivou odpověď v organismu. Produkce cytokinu začíná po navázání CAR-T lymfocytu na nádorový antigen a dochází ke kumulaci v cílové tkáni, což má za cíl chemotaxi ostatních imunokompetentních buněk, jako jsou NK buňky, makrofágy a další. Dochází zde k cílené imunitní reakci mířené proti maligním buňkám. Díky lokální produkci cytokinů v místě nádoru je možnost působit i na solidní nádory. Další výhodou lokální akumulace IL-12 je snížení toxicity léčby CAR-T lymfocytů. (Chmielewski et al., 2014)

TRUCK CAR-T lymfocyty se ukázaly velmi účinné zejména u pacientů s HL a s MM, nicméně opět nelze vyvodit obecný závěr o účinnosti čtvrté generace CAR-T lymfocytů, jelikož i zde je malý soubor pacientů ve studiích. (Grover et al., 2021; Qian et al., 2021)

Pátá generace

CAR-T lymfocyty páté generace vychází strukturou z generace druhé, jejich intracelulární doménu tvoří CD3 ζ s kostimulační doménou CD28. Navíc obsahují membránové receptory, nejslibněji se jeví receptor pro IL-2, který je schopný aktivovat cytokinovou signální dráhu JAK/STAT. T lymfocyty jsou aktivovány nejen pomocí CD3 ζ a CD28, ale také touto signální dráhou. (Kagoya et al., 2018)

Další modifikace CAR-T lymfocytů

Jelikož se CAR-T lymfocyty v klinické praxi ukazují jako užitečné, tak stále dochází k dalšímu vylepšování konstruktů CAR, aby byl co nejúčinnější se snížením nežádoucích účinků. Vědci navrhli různé bezpečnostní strategie, které by tyto nežádoucí účinky měly minimalizovat.

Nežádoucí účinek při léčbě pomocí konvenčních CAR-T lymfocytů tvoří toxicita. Právě tento problém může řešit kontrola aktivity CAR-T lymfocytů. Mezi jeden z mechanismů, jež je studován, patří sebevražedný spínač buněk. Jedná se o geneticky

kódovaný prvek integrovaný do CAR. Ten dokáže po aktivaci eliminovat CAR-T lymfocyty, aktivace nastane podáním farmaceutického přípravku. V případě potřeby, při život ohrožujících nežádoucích účincích, je tedy možné CAR-T lymfocyty vypnout. (Moghanloo et al., 2021)

V současnosti se k výrobě konvenčních CAR-T lymfocytů používají buňky autologní, tedy získané od pacienta, který danou léčbu postupuje. Tento postup s sebou nese určitá omezení, příkladem je dlouhá doba potřebná pro výrobu nebo snížená životaschopnost T lymfocytů u intenzivně léčených pacientů. Proto probíhají výzkumy autologních univerzálních CAR-T buněk, které by tento problém měly vyřešit. Důležitým výrobním krokem je odstranění molekul MHC a TCR, což je možné díky molekulárnímu inženýrství při použití metod pro úpravu genomu. Příkladem je technika TALEN (transcription activator-like effector nucleasy), kdy je vyřazen gen pro α řetězec TCR nebo technika CRISPR/Cas9 (Rafiq et al., 2020). Bezpečnost i proveditelnost techniky CRISPR/Cas9 v klinické praxi byla ověřena autory Stadtmayer et al. v roce 2020, jednalo se o první studii na lidech v tomto ohledu.

6.2.3 Příprava (výroba) CAR-T lymfocytů

Léčba pomocí CAR-T lymfocytů začíná přístrojovou leukaferézou pacientovy krve. Jedná se o autologní odběr, kdy je pacientova periferní krev separována v buněčném separátoru a odebrány jsou pouze mononukleární buňky, zbytek krve se vrací pacientovi zpět do krevního oběhu. Důležité je provedení odběru ve vhodnou dobu, aby bylo zajištěno dostatečné množství T lymfocytů. Takto odebrané buňky jsou následně přepraveny do frakcionačního centra na výrobu CAR-T lymfocytů. V ČR zpracovatelské centrum není, proto jsou buňky odesílány do zahraničí, například do Německa, Francie, Nizozemska a do USA. (Hrabovský, 2020)

Dalším krokem je separace T lymfocytů z odebraných monoklonálních buněk, dochází také k promytí leukaferézního pufru, který obsahuje antikoagulantia. K separaci lze následně použít protiproudovou odstředivou elutriaci, kdy jsou buňky rozděleny podle velikosti a hustoty při zachování buněčné životaschopnosti (Powell et al., 2009). Separované T lymfocyty je dále potřeba aktivovat.

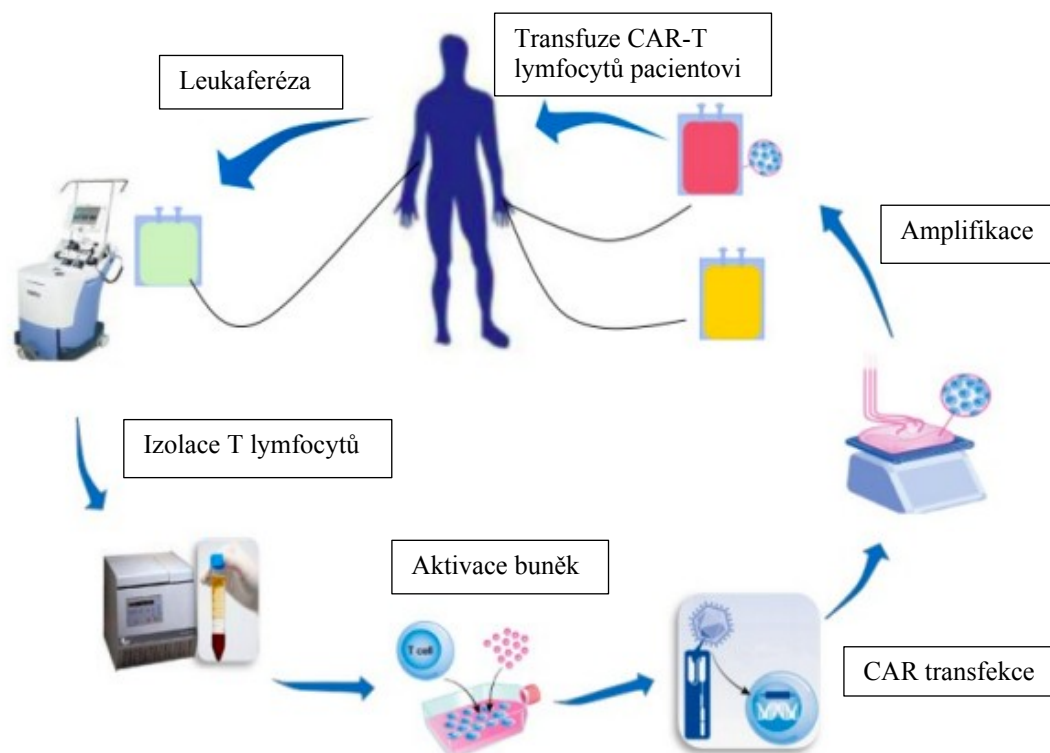
Dříve se využívaly pacientovy dendritické buňky nebo B lymfocyty, tento postup je ale komplikovaný a nyní se již nevyužívá. Jedním ze způsobů aktivace buněk, který je

v dnešní době vhodný k použití, jsou magnetické kuličky potažené monoklonálními protilátkami anti-CD3/anti-CD28, jež jsou obvykle kombinovány s aktivačními interleukiny, například s IL-2. Protilátka anti-CD3 je využívána díky svému silnému proliferačnímu signálu a anti-CD28 zabezpečuje kostimulační signál. Po aktivaci lze kuličky z kultury snadno odstranit, například magnetickou separací. (Chen et al., 2006; Suhoski et al., 2007)

Během aktivace dochází k vložení genu pro CAR. V klinické praxi jsou aplikovány zejména tři hlavní vektory pro expresi genu: retrovirové vektory, lentivirové vektory a transposon/transposázový systém. Prvním vektorem, který byl pro CAR-T lymfocyty použit, byl retrovirový vektor, který je dnes stále hojně používán (X. Wang & Rivière, 2016), například u klinicky schváleného preparátu Yescarta (Roberts et al., 2018). Nevýhoda retrovirových a lentivirových vektorů, jakožto komplexních biologických činidel, je v nutnosti testování jejich biologické bezpečnosti, které je intenzivní a finančně nákladné. Transposon/transposázový systém tento problém nemá a další výhodou je jeho relativně jednoduchá výroba a menší finanční nákladnost. (X. Wang & Rivière, 2016)

Takto připravené buňky se nechají kultivovat v bioreaktorovém kultivačním systému přibližně 9-11 dní. Dochází zde k buněčné expanzi. Tyto systémy poskytují ideální podmínky pro výměnu plynů a také zajišťují míchání kultur, což je v klinické praxi nezbytné kvůli velkému počtu buněk (Levine et al., 2017). Po expanzi buněk v bioreaktoru je nutné upravit vzniklou suspenzi buněčných kultur tak, aby byla vhodná pro podání pacientovi. Objem může dosahovat hodnot až kolem pěti litrů, proto je nutné zkoncentrování objemu. Následně jsou buňky promyty, probíhá testování kvality a bezpečnosti konečného produktu a nakonec jsou kryokonzervovány a dopraveny zpět na klinické pracoviště k podání pacientovi. (Levine et al., 2017)

Obrázek 3: schéma přípravy CAR-T lymfocytů



Zdroj: upraveno, <https://www.creative-biolabs.com/car-t/ind-development-for-car-t-cell-therapy.htm>

6.2.3.1 Kontrola kvality hotových přípravků

Kvůli velké variabilitě designu CAR produktů neexistují přesné normy na kontroly kvality hotových přípravků. Kontrolu je třeba provádět v závislosti na výrobním postupu a vlastnostech produktu. Výroba by měla splňovat požadavky na správnou výrobní praxi. Mezi požadavky patří například dobře vyškolený personál a neustálá dokumentace všech výrobních postupů, pro případ následného dohledání dodržování správných postupů. Mělo by docházet i k meziprocesové kontrole, jež sleduje výrobní postup. Velmi důležité je sledování kvality vektorů pro genovou modifikaci. Rizikem může být mikrobiologická bezpečnost produktu, může docházet ke kontaminaci bakteriemi, mykoplazmaty, houbami a viry, proto je nutné věnovat této oblasti velkou pozornost. Další testy, které se využívají, jsou: test potence (účinnosti), sloužící pro ověření, zda mají CAR-T lymfocyty očekávanou terapeutickou schopnost, a test konzistence kvality produktu mezi jednotlivými šaržemi. (Li et al., 2019)

6.2.4 Podání CAR-T lymfocytů

6.2.4.1 Výběr vhodného pacienta

Terapie pomocí CAR-T lymfocytů není vhodná pro každého pacienta. Existují určité podmínky k určení vhodnosti podání, anamnéza a aktuální fyzický stav pacienta jsou hlavní z nich. U jednotlivých léčebných preparátů se požadavky mohou lišit (Yakoub-Agha et al., 2020). Terapie je dále možná pouze u pacientů, u kterých lze vyvolat imunogenní smrt nádorové buňky (smrt buňky je schopna indukovat imunitní odpověď), což u některých nádorů není možné (Kepp et al., 2011). Leukaferézu u pacienta je možné provést už při absolutní hodnotě lymfocytů $0,1 \times 10^9/l$, avšak u absolutního počtu lymfocytů nad $0,5 \times 10^9/l$ je šance na úspěšnou výrobu léčebného produktu vyšší. Před provedením aferézy je nutné dohodnout s výrobcem konkrétní slot výroby, jelikož výrobní kapacita je omezena. Vzhledem ke zvyšování počtu pacientů může tato skutečnost činit do budoucna potíže. (Yakoub-Agha et al., 2020)

6.2.4.2 Přípravná léčba

Časová náročnost od odběru buněk pacientovi do doby podání hotového CAR produktu je přibližně 3-4 týdny. V tomto období je potřeba u některých pacientů léčba, která je vybírána individuálně v závislosti na charakteru onemocnění. (Mihályová et al., 2022)

Jedním z léčebných přístupů může být překlenovací (tzn. bridging) terapie. Cílem je udržet onemocnění pod kontrolou, zabránit orgánovému poškození a dalším komplikacím, aby mohla být infuze CAR-T lymfocytů po vyrobení podána. Cílem není dosažení remise, proto by také použitá terapie neměla vyvolávat velké komplikace, jelikož je pacient vystaven riziku nežádoucích účinků při následné terapii CAR-T lymfocytů. Překlenovací terapie není nutná vždy. Jestliže je pacientovo onemocnění stabilní, málo agresivní a očekává se krátká výrobní doba, je možné od terapie upustit (Yakoub-Agha et al., 2020). Dalším léčebným přístupem je lymfodepleční terapie (tzn. conditioning), která cílí na vytvoření vhodných podmínek v organismu pro proliferaci a přežití CAR-T lymfocytů. Tato terapie je prováděna v období 3-5 dnů před plánovaným podáním preparátu a měl by ji dostat každý pacient. Jedinou výjimku tvoří pacienti, u kterých je plánován příjem preparátu Kymriah od firmy Novartis a tito pacienti mají počet leukocytů týden před aplikací nižší než $1 \times 10^9/l$. (Yakoub-Agha et al., 2020)

6.2.5 Rozmrazení a převod CAR-T lymfocytů

Připravený koncentrát CAR-T lymfocytů je přepraven do klinického centra v zmraženém stavu s kryoprotektivním roztokem. Jelikož je při přepravě potřebná velmi nízká teplota, využívá se Dewarova nádoba s tekutým dusíkem, k rozmrazení dochází až těsně před podáním pacientovi. CAR-T lymfocyty mohou být rozmrazeny pomocí kalibrované vodní lázně při teplotách 35-37 °C, ideálnějším způsobem je použití automatického rozmrazovacího zařízení. Jako premedikace ke zmírnění nežádoucích účinků může být podáván paracetamol a antihistaminika. Čemu je ovšem nutné se vyhnout, jsou kortikosteroidy, jelikož mohou poškodit CAR-T lymfocyty svými lymfotoxickými účinky. K podání buněk je využíván transfúzní set s filtrem o velikosti pórů 50-200 µm, který je napojen na centrální žilní katetr. Infuze CAR-T lymfocytů je díky malému objemu a počtu buněk velmi rychlá, většinou trvá méně než třicet minut. Samotná transfuze CAR-T lymfocytů je většinou dobře tolerována. (Yakoub-Agha et al., 2020)

6.3 Klinické využití

Od publikování prvního návrhu CAR-T lymfocytů v roce 1993 se jejich vývoj velmi posunul, byly používány nové inženýrské strategie, vznikaly nové generace a účinnost se zlepšovala. Neustále probíhají další studie, k únoru roku 2023 je evidováno 596 právě probíhajících klinických studií v souvislosti s terapií CAR-T lymfocytů ve světě a šest v ČR (ClinicalTrial.gov). Z oblasti klinických výzkumů se technologie dostala také ke komerčnímu využití. Od roku 2017 bylo v USA schváleno již šest preparátů pro klinické použití, v následující tabulce jsou shrnuty základní informace. (cancer.gov)

Tabulka 1: schválené CAR preparáty

Komerční název	Účinná látka	Cílový antigen	Indikace podání	Věk
Kymriah	Tisagenlecleucel	CD19	B-ALL, B-NHL	Děti a dospělí
Yescarta	Axicabtagen ciloleucel	CD19	B-NHL	Dospělí
Tecartus (KTE-X19)	Brexucabtagen autoleucel	CD19	B-ALL, NHL	Dospělí
Breyanzi	Lisocabtagen maraleucel	CD19	B-NHL	Dospělí
Abecma	Idecabtagen vicleucel	BCMA	MM	Dospělí
Carvykti	Ciltacabtagen autoleucel	BCMA	MM	Dospělí

Zdroj: převzato, upraveno <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells> (cancer.gov)

Nejčastějším cílovým antigenem v hematologii při terapii CAR-T lymfocyty je CD19. Vyskytuje se výhradně na B lymfocytech přirozeně se vyskytujících a také na nádorových buňkách B lymfocytární řady. Spolu s B-cell maturation antigenem (BCMA) jsou jedinými antigeny, pro které existuje schválená terapie (viz. tabulka č.1). Dalším sledovaným antigenem je například CD20, CD22 nebo tyrosine kinase-like orphan receptor (ROR1).

6.3.1 ALL

ALL patří mezi maligní onemocnění krvetvorby a jedná se o velice agresivní prekurzorové lymfoproliferace. Nádorové buňky mohou vycházet z prekurzorů B nebo T lymfocytů, avšak případy z B linie převládají. Onemocnění je typické pro dětský věk, 75 % případů se objeví do 6 let věku. ALL se vyskytuje také u dospělých, incidence se zvyšuje zejména u pacientů s věkem nad 55 let (Büchler & kolektiv, 2017). Příznaky onemocnění nejsou příliš specifické, objevuje se například únava, dušnost, bolesti kostí a svalů, zvětšené lymfatické uzliny, zvýšená teplota, pocení, úbytek hmotnosti a krvácivé projevy. Nemoc se na rozdíl od chronické formy vyvine rychle v průběhu několika týdnů. Příčinou ALL je klonální množení abnormálních lymfoblastů. K malignitě v buňce dochází často důsledkem chromozomálních poruch nebo mutací v její genetické informaci. Takto poškozené blasty utlačují normální krvetvorbu v kostní dřeni a následně jsou vyplavovány do periferie a infiltrují další orgány. Při diagnostice jsou využívány metody molekulární genetiky, cytogenetiky, imunofenotypizace, myelogram a laboratorní vyšetření krve. Prognóza ALL je velmi různá, záleží na mnoha faktorech. U většiny pacientů se daří dosáhnout kompletní remise, ovšem velký problém činí vysoký počet relapsů. Velmi dobrou prognózu mají děti, až 90 % z nich dlouhodobě přežívá, dospělí ve věku 18-55 let se pěti let dožívají v 50 % a věková skupina 55-70 let se dožívá 3 let pouze v 20-30 % při léčbě klasickou chemoterapií. (Penka et al., 2011; Büchler et al., 2017)

U relabujících/refrakterních B-ALL mohou k dosažení kompletní remise pomoci právě CAR-T lymfocyty. Existují dva schválené preparáty pro využití u B-ALL, Kymriah a Tecartus. Oba léky cílí na antigen CD19, podání je možné u dospělých pacientů a Kymriah lze podat také u dětí, což ho tvoří jediným preparátem vhodným k podání dětem. Další terapie jsou prováděny formou klinických studií, kterých existuje velké množství. B-ALL bylo jedno z prvních onemocnění, u kterých se začala terapie pomocí CAR-T lymfocytů testovat (Cancer.gov). Funkčnost CAR-T lymfocytů byla prokázána v mnoha výzkumech. Například studie ELIANA z roku 2018 zkoumala 75 dětí a mladých dospělých s relabující/refrakterní B-ALL. U 61 % těchto pacientů došlo v minulosti k relapsu po léčbě alogenní transplantací hematopoetických buněk. Pacientům byl podán preparát Kymriah. Tři měsíce od podání byla celková remise zaznamenána u 81 % léčených. Pozorování pacientů probíhalo 20 měsíců. Autoři

dospěli k závěru, že léčivý preparát Kymriah zajistil vysokou míru remisí a trvalé remise bez další terapie. (Maude et al., 2018)

Míra relapsů u terapie CAR-T lymfocytů s cílovým antigenem CD19 se pohybuje mezi 10-20 %. Pro tyto pacienty jsou vyvíjeny CAR-T lymfocyty s jiným cílovým antigenem (Haso et al., 2013). Autoři Pan et al. publikovali v roce 2019 studii, při které prováděli terapii pomocí CAR-T lymfocytů proti cílovému antigenu CD22. Léčbu podali 34 pacientům s relabující/refrakterní B-ALL, u kterých byla předchozí léčba anti-CD19 CAR-T lymfocyty neúčinná. Po 30 dnech byla celková remise pozorována u 80 % pacientů, dalším pozitivem bylo zaznamenání nízkého výskytu cytotoxicity. Autoři došli k závěru, že anti-CD22 CAR-T lymfocyty byly schopny navodit vysokou míru remise u pacientů, kteří byli v minulosti neúspěšně léčeni chemoterapií, transplantací kostní dřeně a dokonce i anti-CD19 CAR-T lymfocyty. (Pan et al., 2019)

6.3.2 CLL

CLL je maligní lymfoproliferativní onemocnění, které vzniká klonální proliferací malých B lymfocytů. Tyto buňky se kumulují především v periferní krvi, kostní dřeni, játrech a slezině. K určení diagnózy je dostačující laboratorní vyšetření periferní krve s nálezem více než $5 \times 10^9/l$ monoklonálních B lymfocytů typického fenotypu. Pro určení fenotypu buňky je využívána průtoková cytometrie. Pro CLL buňky je typický nález antigenu CD5, CD19, CD20 a CD23. Při mikroskopickém vyšetření periferní krve je nalézáno velké množství jaderných stínů, což je způsobeno velkou fragilitou nádorových lymfocytů. Tento jev je u CLL označován jako Gumprechtovy stíny. CLL je nejběžnější leukémií v Evropě a Americe, ale například v Asii tvoří pouze 3-5 % všech leukémií (Büchler et al., 2017). Při diagnóze činí medián věku 72 let, jedná se tedy o onemocnění starší populace. Příznaky bývají nespecifické, až 70 % pacientů je diagnostikováno zcela náhodně. Mezi symptomy onemocnění patří zvětšené uzliny, později i slezina a játra, u pokročilejších stádií se vyskytuje anemie a trombocytopenie. Prognóza onemocnění je velmi různá. Asymptomatictí pacienti nepodstupují většinou žádnou léčbu, jsou pouze pravidelně sledováni. U fyzicky zdatných pacientů je terapií první volby chemoterapie, u starších pacientů je využívána kombinace s monoklonálními protilátkami. Jedinou kurativní metodou léčby je zatím pouze alogenní transplantace kmenových buněk, tato terapie je vhodná pro mladší pacienty, u

kterých se vyskytuje relabující/refrakterní CLL. (Büchler et al., 2017; Penka et al., 2011)

První případ použití anti-CD19 CAR-T lymfocytů byl zaznamenán právě u pacienta s relabující/refrakterní CLL v roce 2011. Pacient dosáhl kompletní remise a sledován byl dalších 10 měsíců (Porter et al., 2011). I přes tento fakt není zatím schváleno žádné komerční léčivo, které by bylo při CLL indikováno.

Účinnost CAR-T lymfocytů u CLL je ve srovnání s jinými malignitami B buněk nižší, procento dosažení celkové remise se mezi různými výzkumy velmi liší. Metaanalýza publikovaná autory Todorovic et al. z roku 2022 srovnává 15 studií, kdy bylo léčeno více než 100 pacientů s relabující/refrakterní CLL CAR-T lymfocyty. Průměrný počet pacientů, kteří dosáhli remise se pohyboval v rozmezí 0-67 %, s mediánem 30 %, jednotlivé výsledky jsou tedy dosti různé. (Todorovic et al., 2022)

Příčinou neúspěšné léčby může být nádorové mikroprostředí, jež je v porovnání u pacientů s ALL odlišné. Například u T lymfocytů, na které působí maligní buňky CLL, dochází k odlišné expresi genů souvisejících s buněčnou diferenciací nebo cytotoxicitou buněk. Buňky CLL exprimují vysoké hladiny imunomodulačních faktorů jako například TGF- β a IL-10, díky kterým dochází k potlačování odpovědi na antigeny, aktivaci T buněk, expanzi a efektorovou funkci. Přesné mechanismy jsou dále zkoumány. (Görgün et al., 2005)

Léčivo ibrutinib je inhibitor Brutonovy tyrozinkinázy (BTK). B buněčný receptor (BCR) je pro vývoj, aktivaci, proliferaci a přežití T lymfocytů nezbytný. Po stimulaci BCR dochází k aktivaci několika signálních drah, jednou z klíčových kináz těchto drah je BTK. K přežití nádorových buněk u CLL je signální dráha BCR-BTK nezbytná, proto jsou k léčbě využívány inhibitory BTK (Fečková Mihályová et al., 2016).

Autoři Fraietta et al., 2016 ve své studii poukazují na možnost zvýšení účinnosti terapie, při použití tohoto preparátu. Výzkumu se zúčastnili tři pacienti, kteří byli minimálně rok léčeni ibrutinibem s následným podáním CAR-T lymfocytů. Výsledky studie prokázaly, že dlouhodobé užívání tohoto inhibitoru BTK zvrátilo dysfunkci T lymfocytů a také došlo ke zvýšené proliferaci CAR-T lymfocytů. (Fraietta et al., 2016)

6.3.3 NHL

NHL je lymfoproliferativní onemocnění obvykle vznikající v lymfatických tkáních s možností rozšíření do dalších orgánů. Prognóza závisí na histologickém typu, stadiu a léčbě. Podle klinického průběhu je dělíme na indolentní a agresivní. Indolentní typy onemocnění mají relativně dobrou prognózu, medián doby přežití dosahuje až 20 let, využívána je zejména samotná radioterapie. Agresivní typy jsou léčeny kombinovanými režimy chemoterapie a lze vyléčit více než 50 % pacientů. V současnosti jsou lymfoproliferativní onemocnění dělena na základě buněčného původu, tedy na onemocnění B lymfocytů, T lymfocytů a NK buněk. Mezi novotvary periferních B lymfocytů patří například lymfom z pláštěvých buněk (mantle-cell lymphoma, MCL), folikulární lymfom (FL), leukémie z vlasatých buněk, difuzní velkobuněčný lymfom (DLBCL) a Burkittův lymfom. Typů NHL existuje velké množství, zde jsou uvedeny pouze vybrané z nich. Nejčastějším typem B-NHL je DLBCL, tvořící až 30 % případů. U většiny pacientů dochází k rychlému zvětšování tumoru, často s lokálními i systémovými příznaky jako jsou horečka, pocení a hubnutí. (cancer.gov; Büchler & kolektiv, 2017)

Pro léčbu B-NHL jsou vhodné čtyři preparáty ze schválených CAR-T lymfocytů. Účinnost přípravku Yescarta byla ověřena multicentrickou studií ZUMA-1. Do studie bylo zařazeno 111 pacientů s relabujícím/refrakterním agresivním B-NHL. Preparát byl podán 101 pacientům (77 s diagnózou DLBCL) ve věku 23-76 let, s mediánem 58 let. Kompletní remise dosáhlo 54 % a celková míra přežití po 18 měsících byla 52 % (Locke et al., 2017). Účinnost přípravku Kymriah byla ověřena studií JULIET. Terapie proběhla u 111 pacientů ve věku 22-76 let s mediánem 56 let, kdy celkové remise dosáhlo 40 %. (Schuster et al., 2019). U dalšího používaného preparátu Breyanzi, byla účinnost ověřena studií TRANSCEND, kde bylo hodnoceno 269 pacientů s celkovou remisí 53 % (Abramson et al., 2018). Poslední preparát Tecartus je využíván při léčbě relabujícího/refrakterního MCL. Při studii ZUMA-2 bylo léčivo podáno 67 pacientů ve věku 38-79 let s mediánem 65 let. Kompletní remise dosáhlo 67 % pacientů a po 12 měsících sledování byla remise pozorována u 57 % z nich. Všechny tyto preparáty jsou cíleny na antigen CD19, další studované cílové antigeny proti B-NHL jsou CD20, CD30, CD37, CD38. (Marofi et al., 2021)

6.3.4 MM

MM je hematologické nádorové onemocnění postihující kostní dřeň, způsobené proliferací terminálních B lymfocytů – plazmatických buněk s produkcí monoklonálního imunoglobulinu. Jedná se o druhé nejčastější hematologické nádorové onemocnění a představuje 1 % všech nádorů. V době diagnózy je medián věku mezi 65-70 lety, postižena je tedy zejména starší populace. Mezi nejčastější příznaky onemocnění patří bolesti kostí, které se vyskytují asi u 80 % pacientů. Mezi další příznaky jsou řazeny častější infekce, únava, zhoršená funkce ledvin, slizniční krvácení, poruchy zraku a další. Při laboratorním vyšetření je nalézáno poškození kostní dřene se zmnožením plazmocytů. K určení diagnózy je potřeba prokázat alespoň 10 % klonálních plazmatických buněk v kostní dřeni, monoklonální protein v séru nebo moči (s výjimkou nesekrečního typu MM) a prokázání poškození orgánů či tkání myelomem. MM je již považován za vyléčitelné onemocnění, ovšem pouze u malé části nemocných, problémy činí časté a opakované relapsy. (Büchler & kolektiv, 2017; Penka et al., 2011)

K terapii pomocí CAR-T lymfocytů se přistupuje až ve chvíli relabujícího/refrakterního MM. Ve světě jsou momentálně schváleny dva klinické preparáty CAR-T lymfocytů na léčbu MM u dospělých, konkrétně Abecma (účinná látka Idecabtagen vicleucel) a Carvykti (účinná látka Ciltacabtagen autoleucel). Cílovým antigenem je BCMA, který je exprimován pouze na plazmatických buňkách a B lymfocytech. Účinnost CAR-T lymfocytů při léčbě MM byla ověřena mnoha studii. Příkladem může být metaanalýza z roku 2020 publikovaná autory Roex et al. U 640 pacientů bylo použito 23 různých produktů BCMA CAR-T lymfocytů. Celková četnost odpovědí byla 80,5 % a celková remise byla pozorována u 44,8 %. Metaanalýza byla sestavena z 27 studií od roku 2015 do roku 2020. (Roex et al., 2020)

Existují studie, které se zabývají možným použitím dalších antigenů, kromě antigenu BCMA, například antigenů CD38, CD19, CD138 a dalších. (Teoh & Chng, 2021)

6.3.5 Solidní nádory

Solidní nádory jsou nádory vytvářející abnormální pevná ložiska tvořená nádorovými buňkami, obvykle neobsahují cysty nebo tekutinu. Různé typy solidních nádorů jsou pojmenovány podle typu buněk, z kterých nádor vznikl, například: sarkomy, karcinomy

epitelových buněk, nádory mozku, nervů, a další. Jsou tedy opakem hematologických malignit, které solidní nádory nevytvářejí. (NCI,cancer.gov)

Umístění solidních nádorů v těle je pro léčbu pomocí CAR-T lymfocytů komplikací. U hematologických malignit jsou nádorové buňky individuálně rozptýleny v krevním řečišti a kostní dřeni, což činí interakci s nimi jednodušší. U solidních nádorů dochází často k menšímu prokrvení, tím je přístup z krevního oběhu zkomplikován a prostoupení nádorovou masou může být pro CAR-T lymfocyty nemožné. Dalším problémem je výskyt silně inhibičního mikroprostředí. Některé chemokiny produkované solidními nádory brání CAR-T lymfocytům v pohybu a infiltraci k nádorovým lézím, dochází zde také k vysoké expresi inhibičních molekul, které znesnadňují aktivaci imunitního systému. Velkým problémem je také výběr vhodného cílového antigenu, jehož exprese je u solidních nádorů velmi heterogenní. Z těchto důvodů je těžké naleznout antigen, který je exprimován homogenně v celém nádoru napříč mnoha pacienty a co nejméně na buňkách zdravých. A proto, ze všech výše zmíněných důvodů, v dnešní době stále neexistují CAR-T lymfocyty schválené pro léčbu solidních nádorů. (Ma et al., 2019)

Navzdory těmto problémům probíhá mnoho klinických a preklinických studií, kdy se výzkumníci snaží najít způsoby využití CAR-T lymfocytů při léčbě solidních nádorů. Například jsou zkoumány strategie zaměřené na nádorové mikroprostředí, různé varianty cílových antigenů, lokální podání buněk, metabolické modifikace CAR-T lymfocytů a další. Třeba zvýšení terapeutického dosahu terapie je možné dodáním CAR-T lymfocytů lokálně do místa nádoru namísto systémového podání. Autoři Katz et al. podávali CAR-T lymfocyty lokálně do pobřišnice pacientům s kolorektálním karcinomem s metastázami v pobřišnici. Uvedli, že tato metoda vedla ke zvýšené protinádorové aktivitě. (Katz et al., 2016)

6.3.6 Aktuální využití v ČR

V ČR jsou k únoru 2023 registrovány tři schválené anti-CD19 CAR-T preparáty pro klinické použití: Kymriah, Yescarta a Tecartus. Kymriah (Novartis, Irsko) byl schválen 23.8.2018, je indikován k léčbě relabující/refrakterní B-ALL u dětí a mladých dospělých, relabující/refrakterní DLBCL a FL. Obsah životaschopných CAR-T lymfocytů v jedné léčebné dávce je $1,2 \times 10^6$ až 6×10^8 . Přípravek Yescarta (Kite Pharma, Nizozemsko) byl schválen 23.8.2018, k podání je indikován u dospělých

pacientů s relabující/refrakterní DLBCL a FL, v závislosti na hmotnosti pacienta je v přípravku obsaženo $0,4 - 2 \times 10^8$ buněk ($2 \times 10^6/\text{kg}$). Poslední schválený Tecartus (Kite Pharma, Nizozemsko) byl schválen 14.12.2020. Indikován je pro relabující/refrakterní ALL a MCL u dospělých. V přípravku je obsaženo $0,4 - 2 \times 10^8$ buněk CAR-T lymfocytů. (SÚKL)

Na území ČR je k terapii certifikováno šest pracovišť: FN Motol, FN Brno, FN Hradec Králové, VFN Praha, FN Plzeň, FN Ostrava a Ústav hematologie a krevní transfuze (ÚHKT), z toho pouze ve FN Motol je možné podání u dětí. Léčba prvního pacienta CAR-T lymfocyty v ČR proběhla v září roku 2019 ve FN Brno. U 48letého pacienta s DLBCL bylo po neúspěšné standardní léčbě podáno léčivo Yescarta. V ČR je léčba hrazena z veřejného zdravotního pojištění. (FN Brno, 2019)

6.4 Nežádoucí účinky a komplikace

Účinnost terapie CAR-T lymfocyty u hematologických malignit byla klinickými studii prokázána, často je ovšem doprovázena specifickými život ohrožujícími nežádoucími účinky, které vyplývají z cíleného působení terapie. Mezi nejzávažnější a nejčastější patří syndrom uvolnění cytokinů (CRS, cytokine release syndrome), neurologická toxicita, poruchy koagulace a B buněčná aplazie. Komplikací léčby je také velká finanční nákladnost a problémy spojené s logistikou výroby.

6.4.1 Syndrom uvolnění cytokinů

CRS je nejčastější závažnou toxicitou. Jedná se o systémovou zánětlivou reakci, která je charakterizována vysokými horečkami, hypotenzí, hypoxií, srdeční dysfunkcí, únavou a bolestí hlavy. Prvním příznakem bývá horečka, která se může objevit za hodiny až dny (až na ojedinělé případy nejdéle do 14 dnů) po aplikaci infuze CAR-T lymfocytů. Toxicita bývá často reverzibilní a často odezní sama (Brudno & Kochenderfer, 2019). Patogeneze nebyla zatím zcela objasněna, avšak výsledky proběhlých experimentálních studií přinášejí následující možné mechanismy. Po aktivaci CAR-T lymfocytů dochází k četnému uvolňování cytokinů IL-6, IL-10, TNF- α , GM-CSF a IFN- γ , ty potom indukují CRS. Dále je uvolňováno vysoké množství cytokinů (TNF- α) z lyzované nádorové buňky, tyto cytokiny vstupují do krevního řečiště a aktivují endoteliální buňky. Také dochází k aktivaci makrofágů pomocí IFN- γ , aktivované makrofágy následně uvolňují několik cytokinů, ty aktivují endoteliální buňky, které uvolňují IL-6. (Miao et al., 2021)

U pacientů rozlišujeme různé stupně CRS, podle toho se také následně odvíjí léčba. CRS 1. stupně je léčeno symptomaticky, CRS 2. stupně je léčeno symptomaticky a podpůrnou léčbou, u pacientů s vážnějšími komplikacemi bývají podávána imunosupresiva, u CRS 3. a 4. stupně probíhá podpůrná léčba a podávání imunosupresiv, tocilizumab a glukokortikoidy jsou využívány nejčastěji. Tocilizumab je při CRS lékem první volby, funguje na principu blokování receptoru IL-6. Stupeň CRS je možno stanovit i na základě laboratorního vyšetření C reaktivního proteinu (CRP) a feritinu (Miao et al., 2021). Toxicitu může předpovídat i velikost nádorové masy. Studie zjistily, že u pacientů s vyšší nádorovou zátěží je častější výskyt zánětlivých toxicit a

také přežití je v porovnání s pacienty s nižší nádorovou masou kratší. (Hay et al., 2017; Park et al., 2018)

Bezpečnost CAR-T přípravků je možné ovlivnit výrobním procesem. Příkladem může být selekce CD4 a CD8 T lymfocytů po aferéze. Z leukoferetického produktu jsou vyselektovány pouze subpopulace T lymfocytů CD4+ a CD8+, z kterých je následně preparát CAR-T lymfocytů vyroben. Tento proces má za následek zvýšení účinnosti CAR-T lymfocytů, ale bohužel také dochází ke zvýšení zánětlivé toxicity, což způsobují zejména CD4+ T lymfocyty, avšak v kombinaci s CD8+ T lymfocyty dochází k nižší toxicitě bez snížení protinádorové aktivity. Dalším faktorem, který ovlivňuje CRS, je množství podané dávky CAR-T lymfocytů. Snížení dávky koreluje se zmírněním rizika CRS. (Bove et al., 2023; Shah et al., 2020)

Jedna z metaanalýz složená ze 60 studií s 913 účastníky uvádí výskyt CRS u 55,3 % pacientů. (Grigor et al., 2019)

6.4.2 Neurologická toxicita

Neurotoxicita je další systémovou zánětlivou toxicitou, kterou mohou být pacienti léčení CAR-T lymfocyty postiženi, jedná se o druhý nejčastější nežádoucí účinek. Jako symptomy se mohou vyskytovat bolesti hlavy, delirium, záchvaty a mozkový edém. K výskytu těchto příznaků dochází během prvních dvou týdnů, ovšem závažnější příznaky se objevují do 72 hodin. Závažná neurologická toxicita je spojena s vyšší hladinou CRP v krvi (Rivera et al., 2020). Neurotoxicita je také známá jako Immune Effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome (ICANS). Často se vyskytuje současně s CRS, ale nezávislý výskyt je také možný. Patogeneze nebyla zatím zcela vysvětlena, studie poukazují na možné související faktory: zvýšené hladiny IL-1, IL-6, IL-15, TNF- α a IFN- γ v krvi korelují se závažností ICANS. Díky aktivaci endotelových buněk dochází ke zvýšení permeability hematoencefalické bariéry, tím je umožněno cytokinům v krvi vstupovat do mozkomíšního moku, což podporuje rozvoj ICANS, dále mohou i CAR-T lymfocyty vstupovat do mozkomíšního moku a poškozovat CNS (Miao et al., 2021). Terapií první volby jsou kortikosteroidy. Při použití léčiva tocilizumab u ICANS byla prokázána horší účinnost než u CRS, důvodem může být špatná prostupnost léku přes hematoencefalickou bariéru a naopak zvýšená permeabilita pro IL-6 (Brudno & Kochenderfer, 2019). Tocilizumab může dokonce projevy ICANS

zhoršit, což prezentuje studie ZUMAB-1, kdy byl lék podáván pacientům s B-NHL a následně docházelo ke zhoršení příznaků. (Neelapu et al., 2017)

Jedna metaanalýza uvádí průměrný výskyt ICANS u pacientů léčených CAR-T lymfocyty 37,2 % (Grigor et al., 2019), další uvádí incidenci 21,7 % (Cao et al., 2020).

6.4.3 B lymfocytární aplazie

Při použití anti-CD19 CAR-T lymfocytů dochází k působení i na zdravé B lymfocyty, což vede k aplázii B lymfocytů. U pacientů se rozvíjí hypogamaglobulinémie a jsou více náchylní k infekcím. Léčba probíhá podáváním infuzí gamaglobulinů a prevencí infekcí. Aplazie B lymfocytů může přetrvávat rok, ale i déle, do vymizení CAR-T lymfocytů z organismu. Aplazie B lymfocytů tedy může sloužit jako marker pro monitorování aktivity CD19 CAR-T lymfocytů v průběhu času (Miao et al., 2021). Hlášení četnosti B lymfocytární aplazie není uváděno u všech studií, autoři Grigor et al. při své metaanalýze zaznamenali tento nežádoucí účinek u sedmi studií s perzistencí od jednoho měsíce do čtyř let. (Grigor et al., 2019)

6.4.4 Další nežádoucí účinky a komplikace

Mezi další méně běžné nežádoucí účinky spojené s terapií CAR-T lymfocytů patří například anafylaxe, infekce spojené s infuzí, syndrom rozpadu nádoru (TLS, tumor lysis syndrome), poruchy koagulace a cytopenie.

Většina CAR konstruktů obsahuje nehumánní prvky, které mohou být rizikem pro vznik alergických reakcí, alergie ovšem nejsou časté a anafylaxe byly zaznamenány pouze při opakovaném podání infuze CAR-T lymfocytů. (Schubert et al., 2021)

K TLS dochází po lýze velkého množství nádorových buněk, často v důsledku lymfodepleční chemoterapie nebo při podání CAR-T lymfocytů. Jedná se o život ohrožující stav s rizikem arytmií a selháním ledvin. (Miao et al., 2021)

Koagulační dysfunkce jsou relativně častým nežádoucím účinkem, vyskytují se přibližně u 51-56,6 % pacientů léčených CAR-T lymfocyty v období 6-20 dnů po infuzi. Jedná se především o zvýšené hodnoty D-dimerů, prodloužený protrombinový čas, snížený fibrinogen a trombocytopenii. Závažnost koreluje se stupněm CRS.

(Y. Wang et al., 2020)

6.5 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je imunochemická laboratorní metoda, která diagnostikuje optické a fluorescenční vlastnosti buněk. Je využívána jak v klinické praxi, tak ve výzkumných laboratořích. Výhodou metody je citlivost, přesnost a také možnost měřit velký počet buněk za krátký časový úsek, až 100 000 částic za sekundu (Preffer & Dombkowski, 2009). U detekovaných buněk je možné analyzovat jejich počet, velikost, vnitřní strukturu a fluorescenci. Nejvíce je metoda využívána v klinické imunologii, hematologii, nádorové biologii a molekulární biologii. (Preffer & Dombkowski, 2009)

Průtokový cytometr je složen ze tří částí: fluidiky, optiky a elektroniky. Fluidní systém má na starosti transport částic ze suspenze. Částice jsou unášeny nosnou kapalinou a následně dochází k hydrodynamické fokuzaci, díky které jsou částice při měření seřazeny jedna za druhou. Optický systém se skládá z excitační a sběrné optiky. Zdrojem monochromatického záření bývají nejčastěji lasery, kterých je v přístroji několik. Sběrnou optiku tvoří filtry, zrcadla a čočky. Nejsložitější částí celého cytometru je elektronika, která má na starosti monitorování a řízení celého cytometru. Pomocí fotodetektorů dochází k přeměně světelného signálu na měřitelný elektrický impuls. (Marinov, 2008)

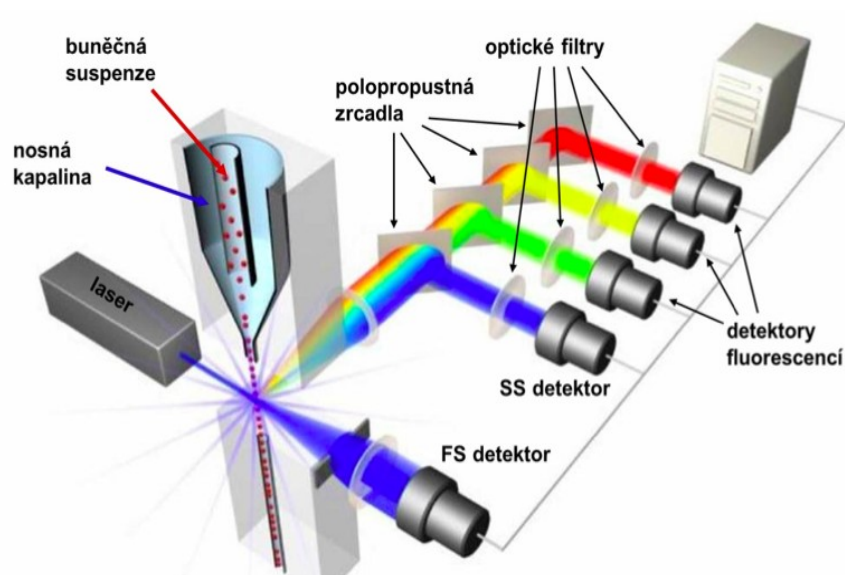
Jedním z měřených parametrů je rozptyl světla, který je detekován ve dvou úhlech: přímý rozptyl (FSC, forward scatter) měřící velikost buněk a boční rozptyl (side scatter, SSC) vypovídající o vnitřní struktuře buňky. Dále je měřeno fluorescenční záření o specifické vlnové délce. Výsledek je zaznamenáván graficky ve formě histogramu (osa x intenzita signálu, osa y četnost) nebo scattergramu, kdy jsou na ose x data z FSC a na ose y data z SSC či ve formě „dot plotu“, kde se na obou osách nachází intenzita fluorescenčního signálu, případně se na jedné ose nachází intenzita fluorescenčního signálu a na druhé ose míra FSC či SSC signálu. (Chattopadhyay & Roederer, 2012)

6.5.1 Průtoková cytometrie v klinické hematologii

V klinické hematologii je velká část použití založena na imunofenotypizaci, tedy na stanovení přítomnosti specifických markerů (CD znaků) na povrchu, v jádře či cytoplazmě buněk. Před měřením je nutné vzorek inkubovat se značenou monoklonální

protilátkou, na které je navázáno fluorescenční barvivo (fluorofor). Následně dochází k vazbě protilátky na cílený CD znak. Dalším krokem je lýza erytrocytů a nakonec dochází k odstranění lyzovaných erytrocytů a nenavázaných protilátek. Fluorofor vydává záření o specifické vlnové délce. Na základě interakce s paprskem laseru je záření detekováno vhodným detektorem. Pro stanovení více typů parametrů z jedné buňky je využíváno více monoklonálních protilátek s různým typem fluorochromů vydávajících signály s odlišnými vlnovými délkami. (Marinov, 2008)

Obrázek 4: schéma průtokového cytometru



Zdroj: převzato <https://www.myeloma.cz/res/file/2016-život-s-mm/6-rihova-Prutokova-cytometrie.pdf>

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 Charakteristika sledovaného souboru

Sledování CAR-T lymfocytů v čase probíhalo u sedmi pacientů, tři žen a čtyř mužů, kteří se léčili ve FN Hradec Králové s diagnózou DLBCL, dostávali terapii CD19 CAR-T lymfocytů. Pacienti byli ve věku od 51 let do 73 let (v době podání přípravku). Všichni měli diagnózu DLBCL, pěti pacientům byl podán preparát Kymriah (Novartis, Irsko) a dvěma pacientům preparát Yescarta (Kite Pharma, Nizozemsko). Nežádoucí účinky ve formě CRS se neobjevily pouze u pacienta č. 7, ICANS nebyl zaznamenán u pacientů č. 5, 6 a 7. Relaps se objevil u tří pacientů. Pacient č. 2 v průběhu terapie zemřel.

Tabulka 2: základní informace o pacientech

Pacient	Pohlaví	Ročník	diagnóza	preparát	Relaps
č. 1	Muž	1961	DLBCL	Kymriah	Ne
č. 2	Muž	1970	DLBCL	Yescarta	Ano, D+86
č. 3	Žena	1954	DLBCL	Kymriah	Ne
č. 4	Muž	1952	DLBCL	Yescarta	Ano, D+120
č. 5	Žena	1948	DLBCL	Kymriah	Ne
č. 6	Žena	1950	DLBCL	Kymriah	Ano, D+11
č. 7	Muž	1959	DLBCL	Kymriah	Ne

Číslování pacientů je náhodné a slouží pouze pro anonymizaci a přehlednější prezentaci výsledků

Tabulka 3: další informace o pacientech

Pacient	Stupeň CRS toxicity	Stupeň ICANS toxicity	Výtěžek CD3+(10 ⁹ /l) z aferézy
č. 1	2	3	12,74
č. 2	2	4	11,44
č. 3	1	3	6,01
č. 4	1	3	25,51
č. 5	2	0	4,46
č. 6	2	0	7,60
č. 7	0	0	19,43

7.2 Metodika

7.2.1 Zpracování vzorku

Pacientům byly odebrány vzorky plné krve do zkumavky s protisrážlivým činidlem K3EDTA. Krev byla dopravena do laboratoře a následně zpracována pro měření na průtokovém cytometru.

Pro stanovení subpopulace lymfocytů byla používána zkumavka s předem připravenými sušenými reagensy (tabulka č. 5) vyrobená firmou Exbio (Praha, ČR). Pro stanovení CAR-T lymfocytů se využívalo přímé detekce pomocí protilátky antiFMC63 scFv od firmy Acro Biosystems (Newark, DE USA). Jedná se o monoklonální myši protilátku izotypu IgG1/kappa, která je specifická proti FMC63. (ACROBiosystems, n.d.)

Tabulka 4: složení sušených reagensů ve zkumavce firmy Exbio

Fluorochrom	PB	PO	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
Specifická	CD20	CD45			CD4	CD19	CD3	CD8
Katalogové číslo	ED7180-1	ED7094-1			ED7199-1	ED7133-1	ED7162-1	ED7109-1
Klon	2H7	2D1			MEM-241	LT19	UCHT1	MEM-31

Do zkumavky se sušenými protilátkami bylo přidáno 5 µl protilátky antiFMC63, následně bylo přidáno 100 µl pacientovy plné krve, obsah zkumavky byl řádně zvortexován a následně se vzorek nechal inkubovat patnáct minut ve tmě při laboratorní teplotě. Po uplynulém čase byl vzorek zlyzován 600 µl lyzačního roztoku. Po dalších deseti minutách byl vzorek promyt na centrifuze při 1100 otáčkách šest minut, poté došlo ke slítí supernatantu, protřepání peletu a doplnění 200 µl fyziologického roztoku. Tímto byl vzorek připraven k měření na průtokovém cytometru Navios 10 (Beckman Coulter, Miami FL, USA).

7.2.2 Metodika zpracování dat

Naměřená data z průtokového cytometru byla zpracována v programu Kaluza C 1.1 (Beckman Coulter), kde byl vytvořen protokol pro měření CAR-T lymfocytů.

Naměřené výsledky jsou zobrazeny pomocí dot plotů, kdy jsou na ose x a y různé sledované parametry. Určuje se pozitivita či negativita sledovaných znaků, na ose x

roste pozitivita směrem doprava a na ose y směrem nahoru. Lymfocyty na svém povrchu exprimují znak CD45 a také mají nízkou granularitu. T lymfocyty exprimují znak CD3, Th lymfocyty CD3 a CD4, Tc lymfocyty CD3 a CD8, B lymfocyty CD19 a CD20. Pro získání informací o počtu buněk je potřeba sledovanou populaci označit, vytvořit „gate“. Počty buněk zagatované populace jsou udávány v procentech.

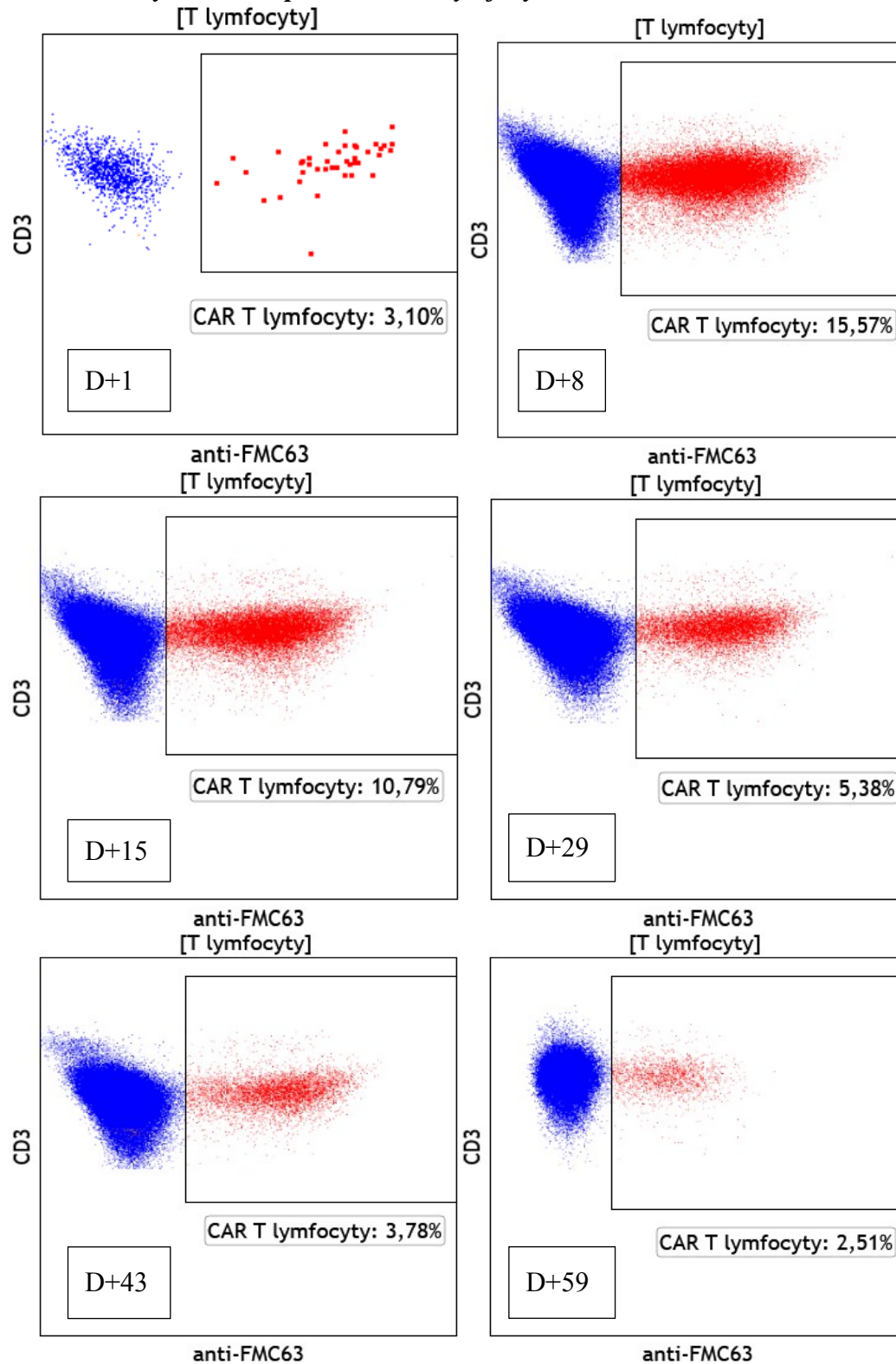
Nejdříve byly pomocí parametrů velikosti a granularity buněk gatovány leukocyty, ze kterých byly následně hodnoceny lymfocyty sledováním exprese znaku CD45 a velikostí buněk. Z lymfocytů byly hodnoceny následující parametry: T lymfocyty byly gatovány pomocí exprese znaku CD3 a velikostí buněk, Th lymfocyty pozitivitou znaků CD4 a CD3, Tc lymfocyty pozitivitou CD8 a CD3. CAR-T lymfocyty byly sledovány z různých zdrojových populací pomocí protilátky proti FMC63 scFv. Například CAR-T lymfocyty z T lymfocytů byl určeny z populace T lymfocytů při sledování positivity protilátky antiFMC63 (osa x) a znaku CD3 (osa y), stejným principem probíhalo hodnocení ostatní populace CAR-T lymfocytů.

Grafy byly vytvořeny pomocí programu Microsoft Excel. Grafy zobrazují pozorování populace CAR-T lymfocytů v čase, kdy je na ose x vyneseno datum podání v přepočtu na dny (D) od první aplikace CAR-T lymfocytů ve formátu D+x. Na ose y je procentuální zastoupení dané populace. U grafů jednotlivých pacientů je vždy zobrazena populace CAR-T lymfocytů a populace, ze které byly CAR-T lymfocyty počítány. U grafů, kde jsou zaneseni všichni pacienti v čase, je na ose y vyjádřen počet dní od aplikace ve formátu jednoho dne od aplikace (D+1d) a následně v týdnech od aplikace (D+xt) a měsících od aplikace (D+xm) z důvodu rozdílného odběru u pacientů.

8. VÝSLEDKY

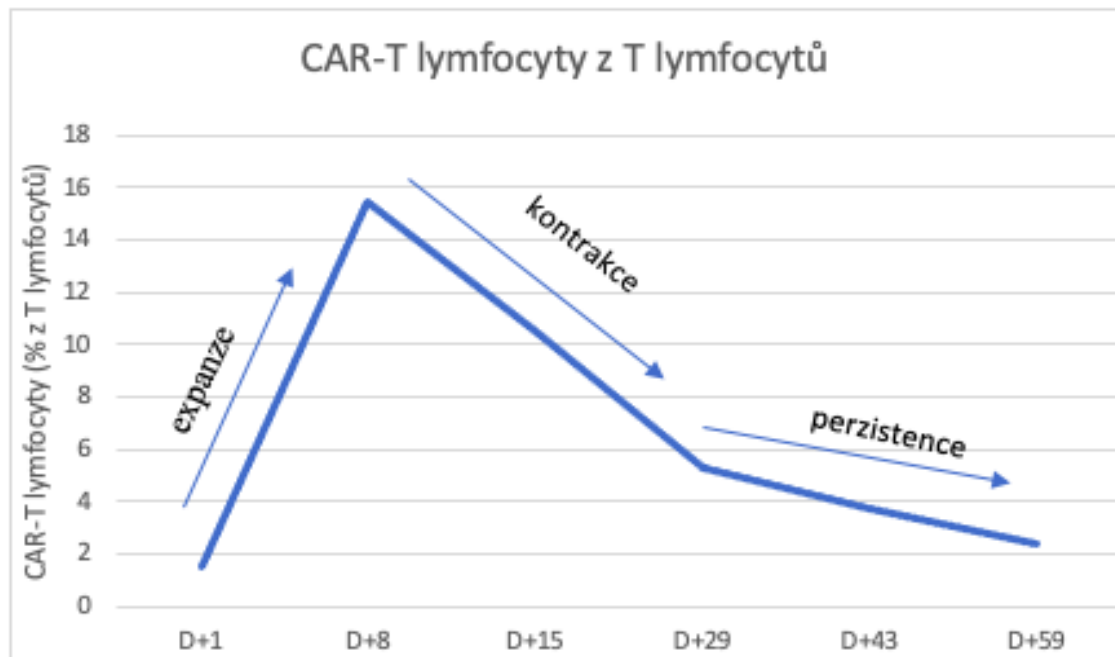
8.1 Dynamika expanze CAR-T lymfocytů

Obrázek 5: dynamika expanze CAR-T lymfocytů



Na obrázku č. 5 jsou zobrazeny grafy z programu Kaluza, ve kterém byla zpracována data z průtokového cytometru. Jedná se o hodnocení CAR-T lymfocytů z populace T lymfocytů u stejného pacienta (pacient č. 5), kdy na ose x byla sledována protilátka antiFMC63 a na ose y znak CD3 . U každého dot plotu je v levém dolním rohu uveden počet dní od aplikace preparátu. Tyto obrázky demonstrují expanzi CAR-T lymfocytů v čase, pro lepší znázornění byla data převedena do grafu (graf č. 2).

Graf 18: dynamika expanze CAR-T lymfocytů



V první fázi dochází k rychlému nárůstu počtu CAR-T lymfocytů, období expanze, které probíhá od prvního dne podání do přibližně jednoho až dvou týdnů od podání, zde je vrchol 8. den od podání. Dále následuje fáze, kdy počet CAR-T lymfocytů rychle klesá a jako poslední fáze následuje období, kdy počet CAR-T lymfocytů postupně klesá v průběhu měsíců, neboli období perzistence. Dynamika expanze CAR-T lymfocytů může být u každého pacienta variabilní. Zdrojem použitých termínů k popisu dynamiky CAR-T lymfocytů byla práce autorů Peinelt et al., 2022.

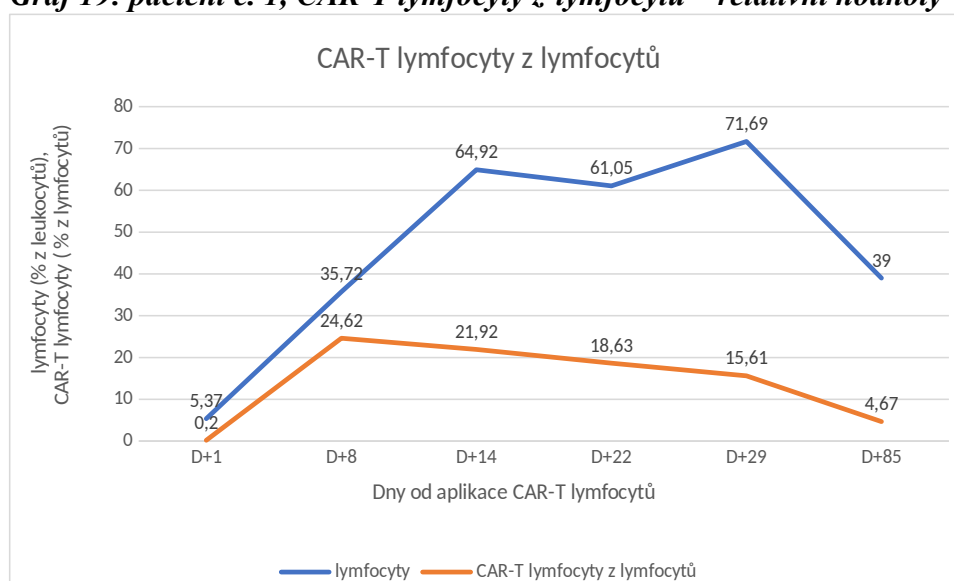
8.2 Pacient č. 1

Tabulka 5: výsledky pacienta č. 1

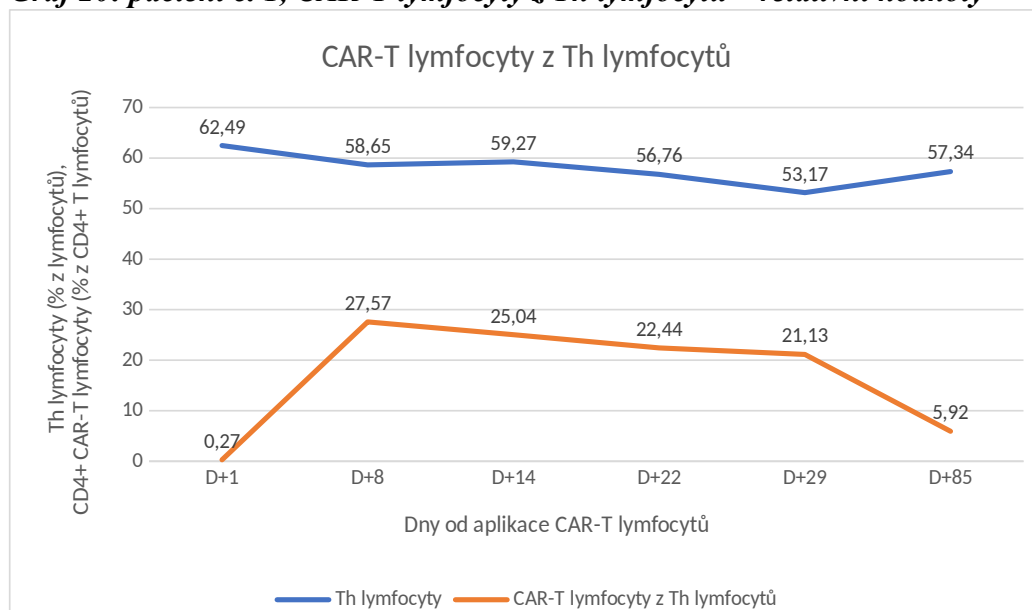
Den po aplikaci	Lymfocyty (% z leukocytů)	T lymfocyty (% z lymfocytů)	B lymfocyty (% z lymfocytů)	Th lymfocyty (% z lymfocytů)	Tc lymfocyty (% z lymfocytů)	Leukocyty (% z materiálu)	Absolutní počet buněk na μ l krve
D+1	5,37	98,06	0	62,49	34,30	1,59	0,10
D+8	35,72	99,18	0	58,65	39,84	2,97	340
D+14	64,92	97,91	0	59,27	38,23	3,22	439,50
D+22	61,05	97,64	0	56,76	40,32	2,45	279
D+29	71,69	93,77	0	53,17	40,06	2,42	256,60
D+85	39,00	96,59	0	57,34	38,87	2,42	44,50

Den po aplikaci	CAR-T lymfocyty z lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z T lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z leukocytů (%)
D+1	0,20	0,20	0,27	0,07	0,01
D+8	24,62	24,82	27,57	20,91	9,17
D+14	21,92	22,39	25,04	18,48	14,68
D+22	18,63	19,07	22,44	14,46	11,98
D+29	15,61	16,65	21,13	10,98	11,16
D+85	4,67	4,86	5,92	3,36	1,87

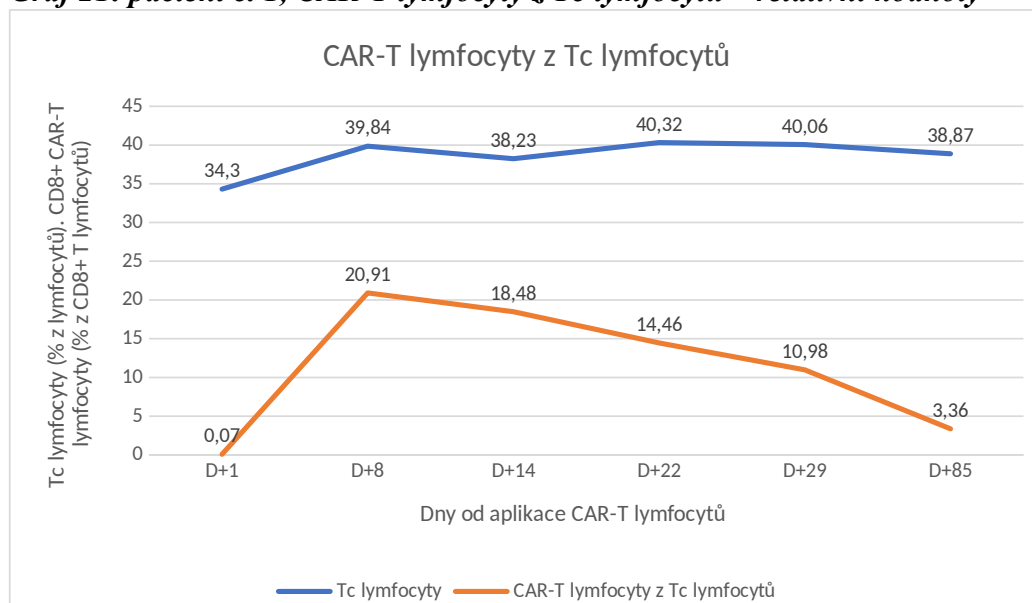
Graf 19: pacient č. 1, CAR-T lymfocyty z lymfocytů – relativní hodnoty



Graf 20: pacient č. 1, CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů – relativní hodnoty



Graf 21: pacient č. 1, CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů – relativní hodnoty



U pacienta č. 1 byla zaznamenána klasická dynamika expanze CAR-T lymfocytů. Po prvním dnu po aplikaci přípravku Kymriah bylo v krvi pacienta prokázáno minimální množství CAR-T lymfocytů, následovala výrazná expanze v osmém dnu od aplikace, kdy CAR-T lymfocyty z různých populací dosáhly svého vrcholu a během následujících týdnů docházelo k postupnému poklesu, poslední zaznamenaná hodnota byla v 85. dnu od aplikace, kdy bylo zaznamenáno 4,67 % CAR-T lymfocytů z populace lymfocytů (graf č.1), byl tedy pozorován pokles o 20 % z nejvyšší zaznamenané hodnoty.

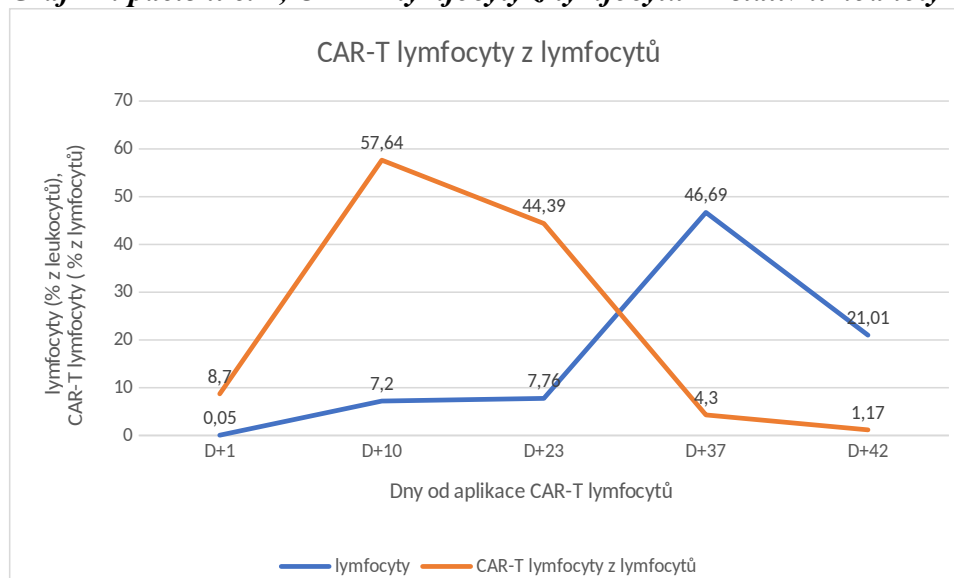
8.3 Pacient č. 2

Tabulka 6: výsledky pacienta č. 2

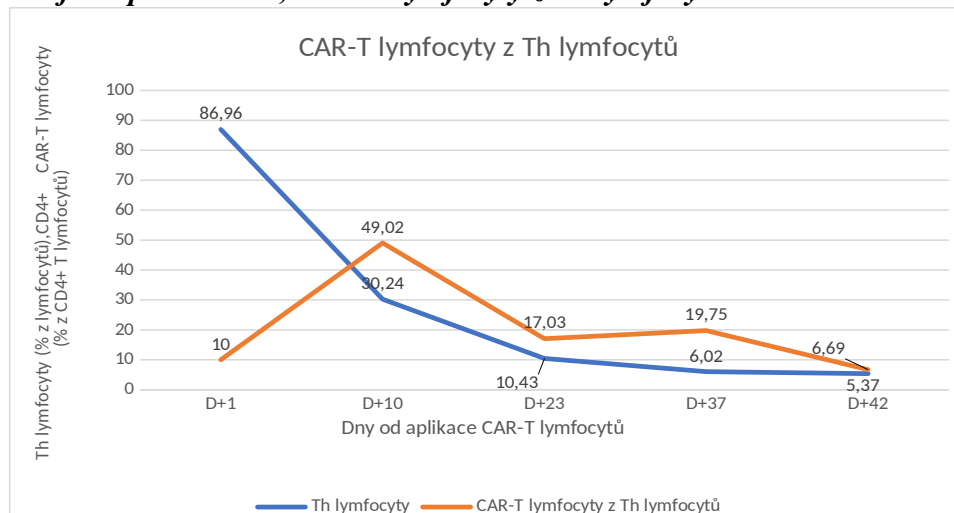
Den po aplikaci	Lymfocyty (% z leukocytů)	T lymfocyty (% z lymfocytů)	B lymfocyty (% z lymfocytů)	Th lymfocyty (% z lymfocytů)	Tc lymfocyty (% z lymfocytů)	Leukocyty (% z materiálu)	Absolutní počet buněk na μ l krve
D+1	0,05	95,65	0	86,96	4,35	2,03	0
D+10	7,20	97,60	0	30,24	66,80	2,38	91
D+23	7,76	95,64	0	10,43	77,53	1,92	63
D+37	46,69	19,67	0	6,02	11,04	2,81	46
D+42	21,01	15,58	0	5,37	8,23	6,24	13

Den po aplikaci	CAR-T lymfocyty z lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z T lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z leukocytů (%)
D+1	8,70	9,09	10,00	0	0
D+10	57,64	59,04	49,02	64,64	4,30
D+23	44,39	46,41	17,03	50,36	3,53
D+37	4,30	21,88	19,75	20,04	1,87
D+42	1,17	7,49	6,69	6,82	0,23

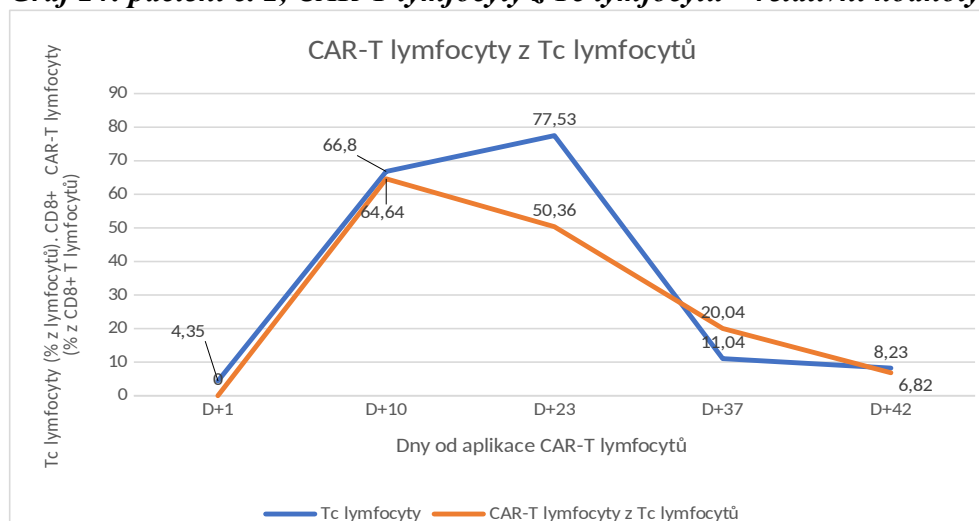
Graf 22: pacient č. 2, CAR-T lymfocyty z lymfocytů – relativní hodnoty



Graf 23: pacient č. 2, CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů – relativní hodnoty



Graf 24: pacient č. 2, CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů – relativní hodnoty



U pacienta č. 2 je dynamika expanze CAR-T lymfocytů v čase povětšinou klasická. První den po aplikaci bylo detekováno malé množství CAR-T lymfocytů a následovala výrazná expanze desátý den od aplikace. Období rychlého poklesu nastalo až 23. den od aplikace a následovalo období perzistence CAR-T lymfocytů. Výjimku v dynamice tvoří CAR-T lymfocyty z populace Th lymfocytů, kde došlo k rychlému poklesu už od desátého dne od aplikace a dokonce mezi 23. a 37. dnem od aplikace došlo k nárůstu o 2,72 % a následně opět došlo k poklesu buněk. Zajímavý byl také počet lymfocytů, který byl z počátku velmi nízký a vyšších hodnot bylo dosaženo až 37. den od podání přípravku. V desátém dnu od aplikace bylo zastoupení CAR-T lymfocytů z populace lymfocytů 50 %. Pacient byl sledován do 42. dne od aplikace, 86. den od aplikace byl u pacienta zjištěn relaps onemocnění, další sledování nebylo možné z důvodu úmrtí pacienta (100 dní od podání).

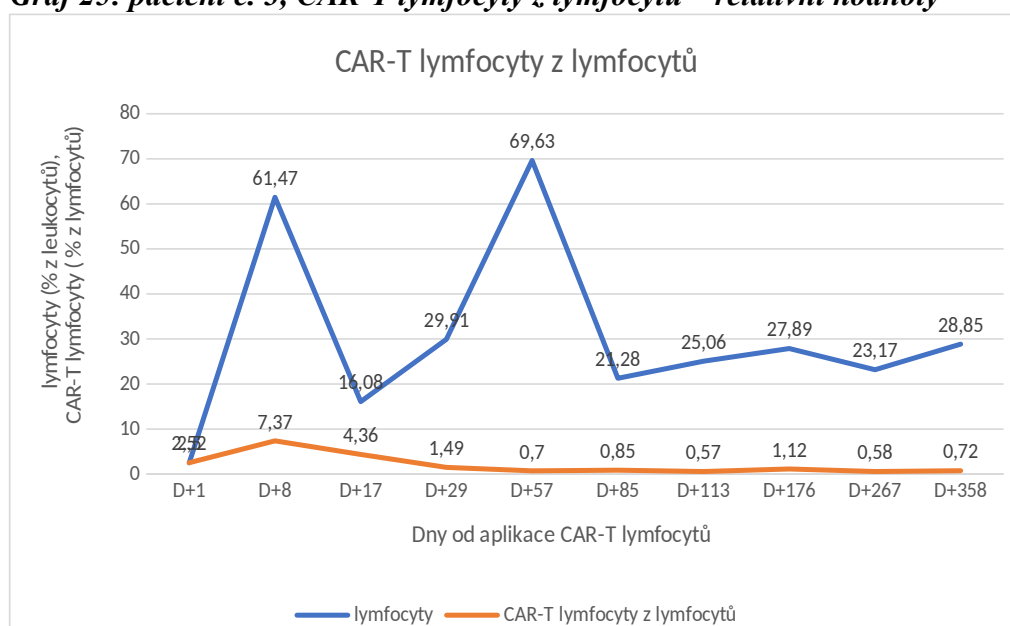
8.4 Pacient č. 3

Tabulka 7: výsledky pacienta č. 3

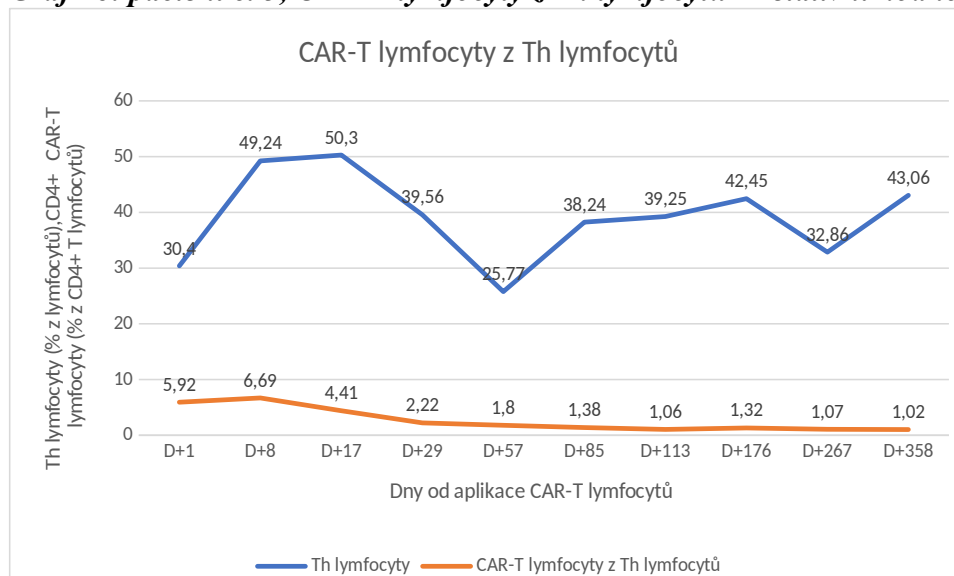
Den po aplikaci	Lymfocyty (% z leukocytů)	T lymfocyty (% z lymfocytů)	B lymfocyty (% z lymfocytů)	Th leukocyty (% z lymfocytů)	Tc leukocyty (% z lymfocytů)	Leukocyty (%z materiálu)	Absolutní počet buněk na μ l krve
D+1	2,50	94,96	x	30,40	59,35	0,72	0,46
D+8	61,47	96,37	x	49,24	36,98	0,62	28,50
D+17	16,08	91,82	x	50,30	30,46	6,19	168
D+29	29,91	87,79	x	39,56	39,78	5,15	24
D+57	69,63	92,52	x	25,77	58,15	6,42	31,50
D+85	21,28	92,91	x	38,24	49,14	7,38	2,10
D+113	25,06	91,88	0	39,25	50,38	4,73	10
D+176	27,89	92,35	0	42,45	47,94	4,05	12
D+267	23,17	89,11	0	32,86	55,13	6,54	10
D+358	28,85	90,17	0	43,06	44,14	8,23	16,20

Den po aplikaci	CAR-T lymfocyty z lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z T lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z leukocytů (%)
D+1	2,52	2,65	5,92	0,91	0,12
D+8	7,37	7,64	6,69	10,67	4,60
D+17	4,36	4,74	4,41	6,50	0,65
D+29	1,49	1,69	2,22	1,46	0,44
D+57	0,70	0,75	1,80	0,36	0,50
D+85	0,85	0,92	1,38	0,53	0,19
D+113	0,57	0,62	1,06	0,28	0,12
D+176	1,12	1,21	1,32	0,96	0,35
D+267	0,58	0,65	1,07	0,38	0,13
D+358	0,72	0,80	1,02	0,32	0,23

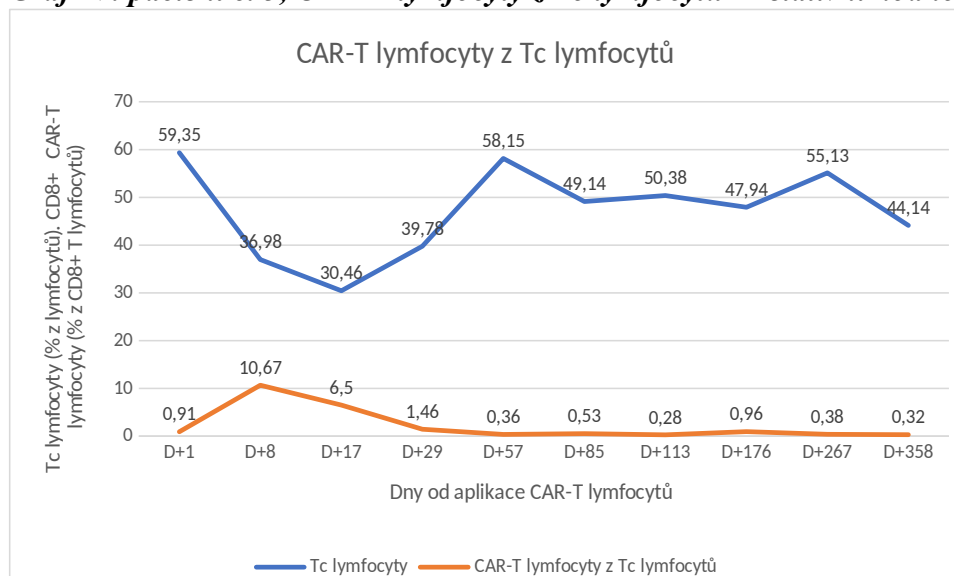
Graf 25: pacient č. 3, CAR-T lymfocyty z lymfocytů – relativní hodnoty



Graf 26: pacient č. 3, CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů – relativní hodnoty



Graf 27: pacient č. 3, CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů – relativní hodnoty



U pacientky č. 3 dosahovala expanze CAR-T lymfocytů nižších hodnot. První den po podání přípravku bylo detekováno malé množství CAR-T lymfocytů, v osmém dnu od podání byla pozorována expanze, která ovšem dosahovala spíše nižších hodnot, následoval pokles CAR-T lymfocytů a od 29. dne od podání byla pozorována perzistence CAR-T lymfocytů. Poslední hodnocení proběhlo 358. den od aplikace, kdy i přes nižší hodnoty při expanzi byly stále CAR-T lymfocyty v krvi pozorovány. Zajímavý byl počet lymfocytů v čase, kdy hodnoty lymfocytů nekorelovaly s hodnotami CAR-T lymfocytů. Hodnoty lymfocytů v čase prudce stoupaly a klesaly, zatímco rozložení hodnot CAR-T lymfocytů mělo konstantní průběh.

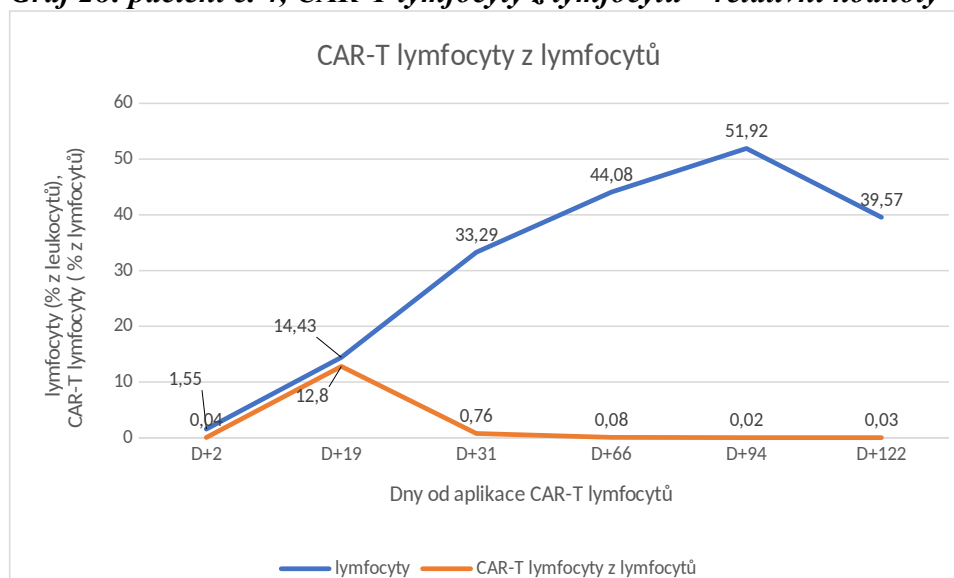
8.5 Pacient č. 4

Tabulka 8: výsledky pacienta č. 4

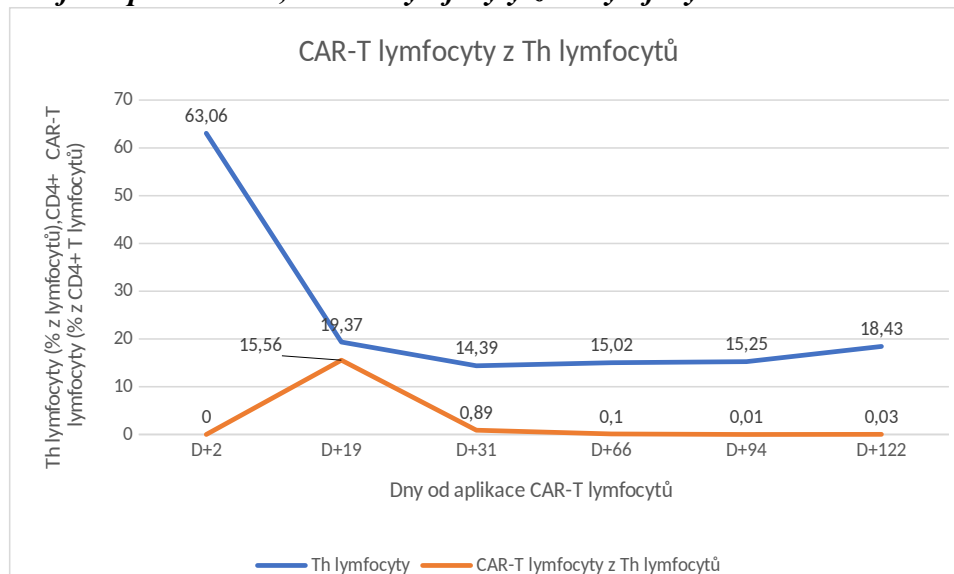
Den po aplikaci	Lymfocyty (% z leukocytů)	T lymfocyty (% z lymfocytů)	B lymfocyty (% z lymfocytů)	Th lymfocyty (% z lymfocytů)	Tc lymfocyty (% z lymfocytů)	Leukocyty (% z materiálu)	Absolutní počet buněk na μ l krve
D+2	1,55	96,13	0	63,06	32,71	3,01	0
D+19	14,43	94,32	0	19,37	71,32	4,70	83
D+31	33,29	93,01	0	14,39	70,93	3,10	7
D+66	44,08	84,56	0	15,02	67,12	4,82	1,50
D+94	51,92	79,04	0	15,25	59,74	5,53	0,50
D+122	39,57	79,85	0	18,43	57,82	4,43	0,40

Den po aplikaci	CAR-T lymfocyty z lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z T lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z leukocytů (%)
D+2	0,04	0,04	0	0,11	0,001
D+19	12,80	8,07	15,56	2,67	1,97
D+31	0,76	0,82	0,89	0,86	0,30
D+66	0,08	0,09	0,10	0,09	0,03
D+94	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02
D+122	0,03	0,04	0,03	0,03	0,08

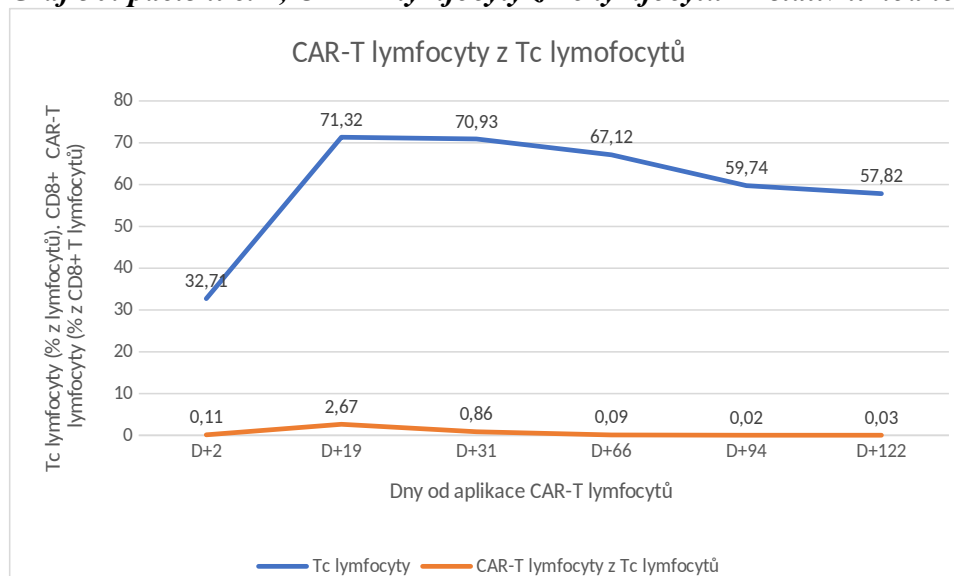
Graf 28: pacient č. 4, CAR-T lymfocyty z lymfocytů – relativní hodnoty



Graf 29: pacient č. 4, CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů – relativní hodnoty



Graf 30: pacient č. 4, CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů – relativní hodnoty



Pozorování dynamiky expanze CAR-T lymfocytů bylo u pacienta č. 4 klasické. První den od podání bylo pozorováno velmi malé množství CAR-T lymfocytů, následovala expanze v 19. dnu od podání (výsledky z prvního týdne nebyly k dispozici). V následujících dnech docházelo k rychlému poklesu a od 31. dne od aplikace byla pozorována perzistence velmi nízkých hodnot CAR-T lymfocytů. Poslední hodnota byla zaznamenána 122. den od aplikace, kdy bylo stále prokázáno velmi malé množství CAR-T lymfocytů. I přes tento fakt, došlo u pacienta 120. den od podání přípravku k relapsu.

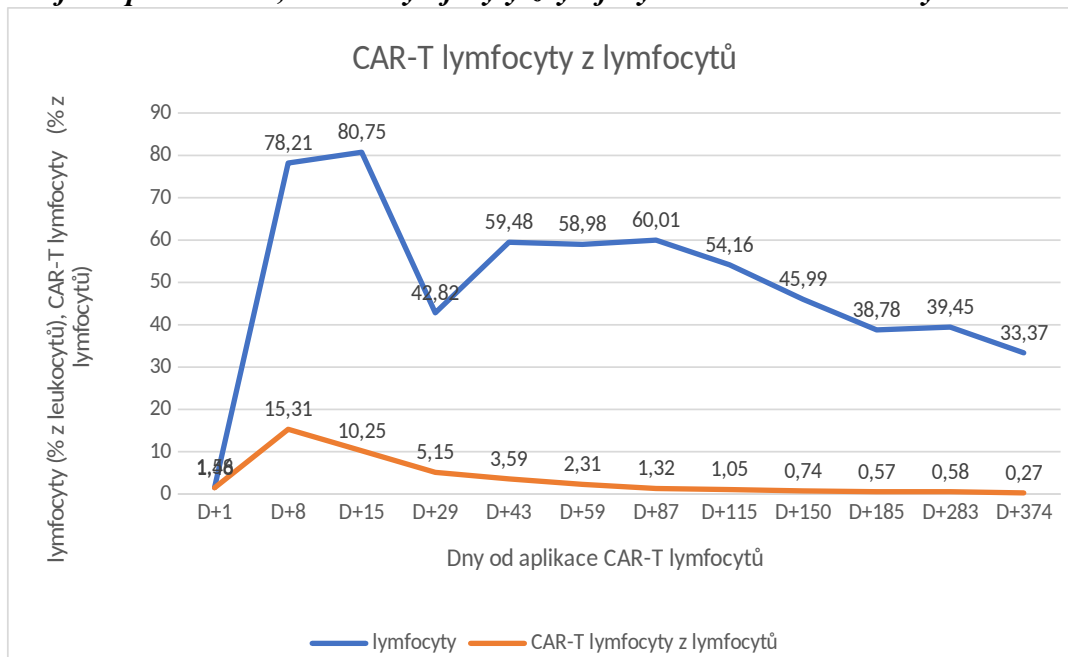
8.6 Pacient č. 5

Tabulka 9: výsledky pacienta č. 5

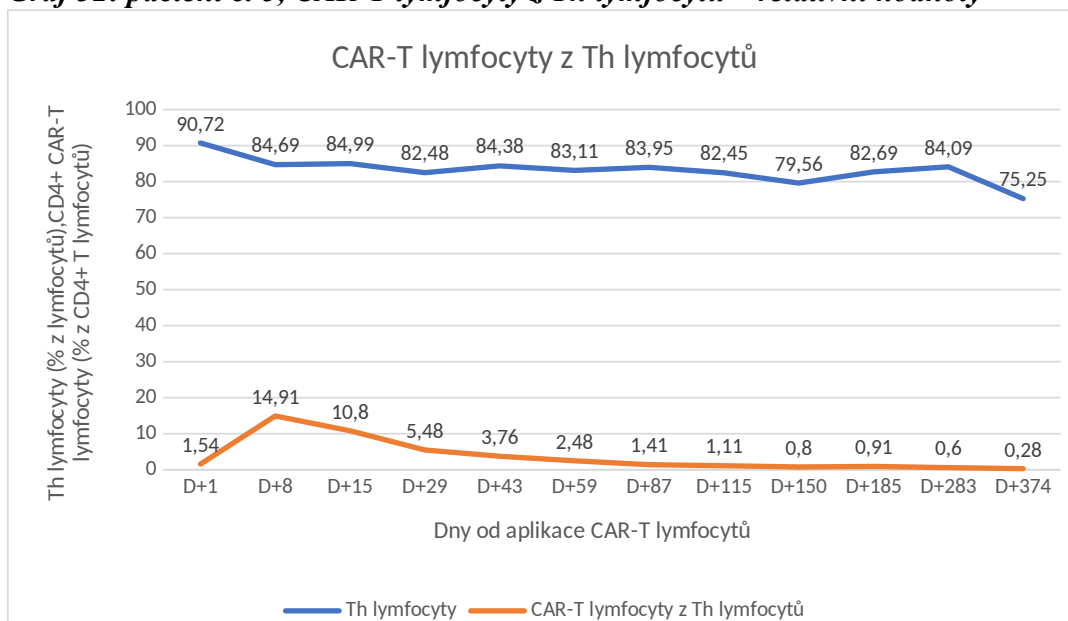
Den po aplikaci	Lymfocyty (% z leukocytů)	T lymfocyty (% z lymfocytů)	B lymfocyty (% z lymfocytů)	Th leukocyty (% z lymfocytů)	Tc leukocyty (% z lymfocytů)	Leukocyty (% z materiálu)	Absolutní počet buněk na μ l krve
D+1	1,56	98,16	0	90,72	7,04	3,39	0,90
D+8	78,21	98,80	0	84,69	12,93	12,79	1570
D+15	80,75	97,54	0	84,99	11,98	9,89	820
D+29	42,82	96,75	0	82,48	13,35	11,64	270
D+43	59,48	96,42	0	84,38	11,34	8,59	170
D+59	58,98	94,70	0	83,11	11,11	7,88	109
D+87	60,01	94,13	0	83,95	9,50	6,43	45
D+115	54,16	94,88	0	82,45	11,57	7,09	40
D+150	45,99	90,71	0	79,56	10,34	6,49	18
D+185	38,78	95,28	0	82,69	16,93	5,93	15
D+283	39,45	94,72	0	84,09	15,31	4,09	9
D+374	33,37	88,65	0	75,25	12,62	5,99	5,60

Den po aplikaci	CAR-T lymfocyty z lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z T lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z leukocytů (%)
D+1	1,48	1,51	1,54	0,57	0,04
D+8	15,31	15,49	14,91	20,07	12,68
D+15	10,25	10,50	10,80	8,25	7,64
D+29	5,15	5,32	5,48	4,21	2,29
D+43	3,59	3,72	3,76	3,31	2,20
D+59	2,31	2,44	2,48	2,18	1,37
D+87	1,32	1,40	1,41	1,10	0,73
D+115	1,05	1,11	1,11	1,02	0,58
D+150	0,74	0,82	0,80	0,64	0,25
D+185	0,57	0,86	0,91	0,60	0,32
D+283	0,58	0,61	0,60	0,60	0,22
D+374	0,27	0,31	0,28	0,26	0,11

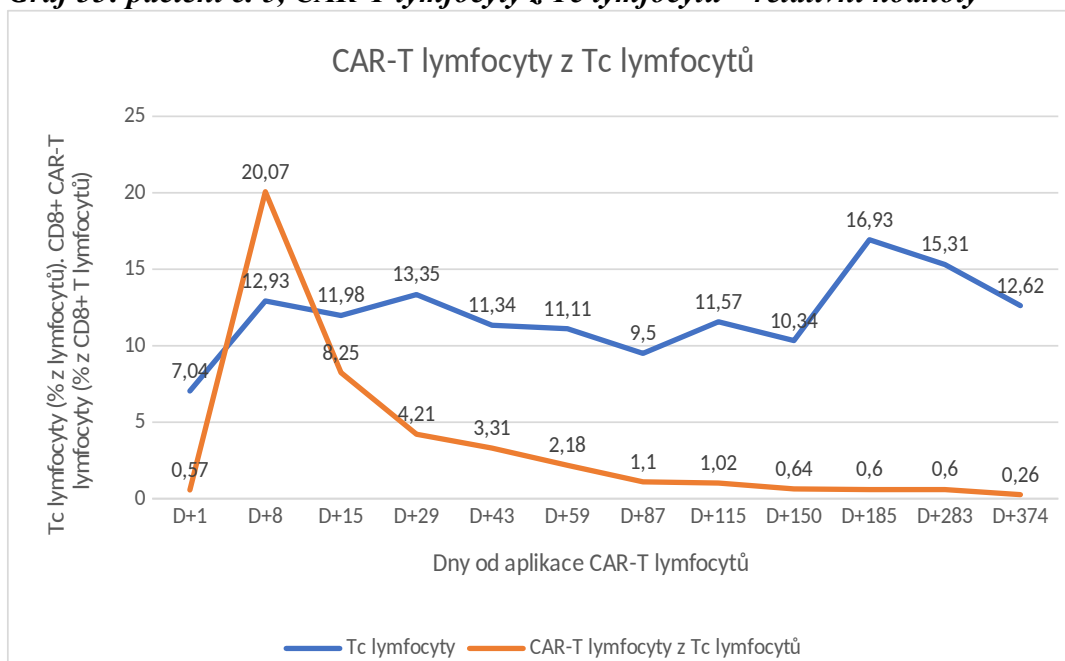
Graf 31: pacient č. 5, CAR-T lymfocyty z lymfocytů – relativní hodnoty



Graf 32: pacient č. 5, CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů – relativní hodnoty



Graf 33: pacient č. 5, CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů – relativní hodnoty



U pacientky č. 5 byla opět pozorována klasická dynamika expanze CAR-T lymfocytů. První den po aplikaci bylo pozorováno malé množství CAR-T lymfocytů, následovala výrazná expanze v osmém dnu od podání. Období rychlého poklesu CAR-T lymfocytů probíhalo do 29. dne od aplikace a následovalo období perzistence. CAR-T lymfocyty byly u pacientky stále detekovány i 374. den od podání přípravku.

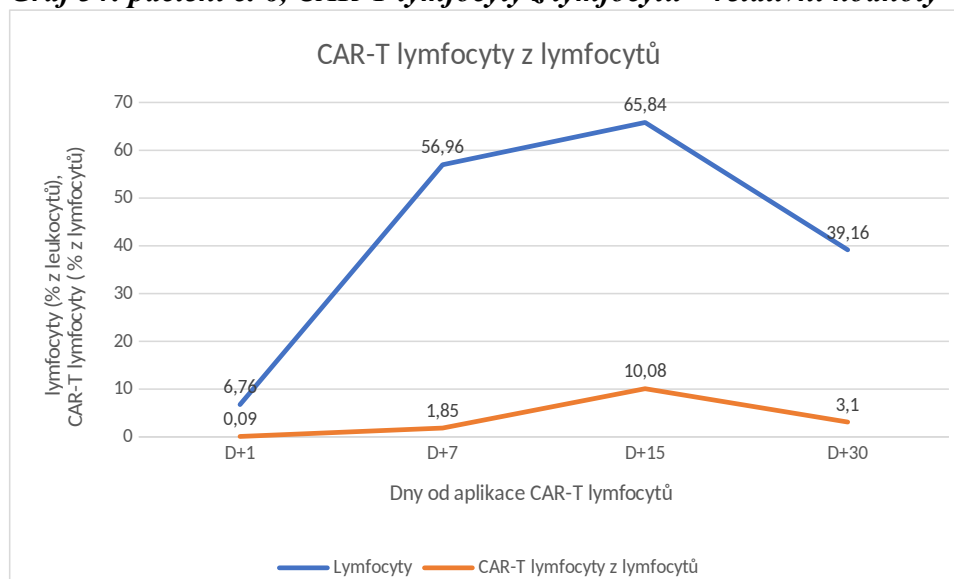
8.7 Pacient č. 6

Tabulka 10: výsledky pacienta č. 6

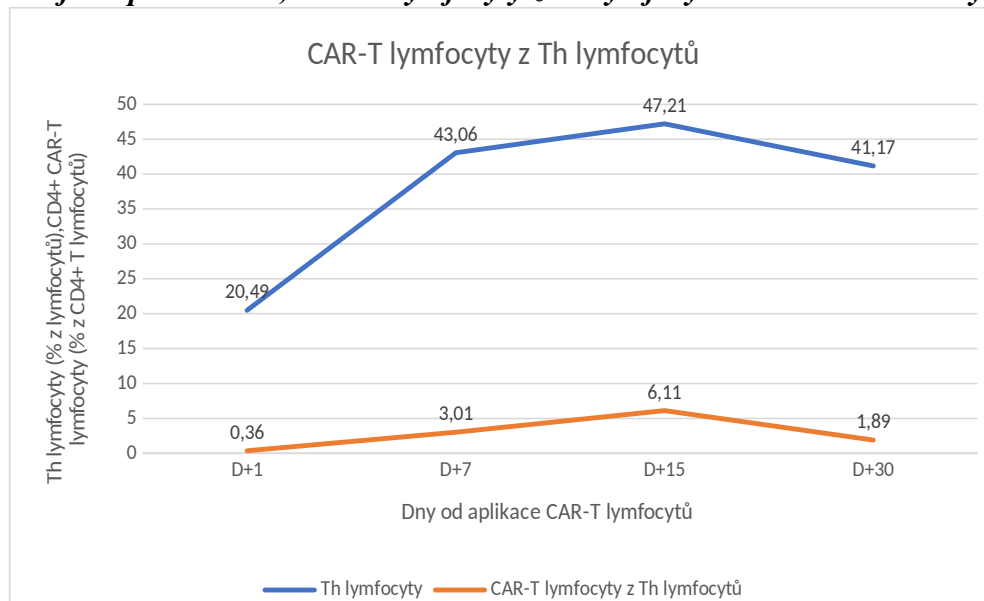
Den po aplikaci	Lymfocyty (% z leukocytů)	T lymfocyty (% z lymfocytů)	B lymfocyty (% z lymfocytů)	Th lymfocyty (% z lymfocytů)	Tc lymfocyty (% z lymfocytů)	Leukocyty (% z materiálu)	Absolutní počet buněk na μ l krve
D+1	6,76	86,60	0	20,49	63,80	3,48	0,18
D+7	56,96	96,46	0	43,06	52,30	4,87	51,30
D+15	65,84	94,47	0	47,21	47,57	2,68	153,80
D+30	39,16	97,57	0	41,17	54,66	1,43	16,90

Den po aplikaci	CAR-T lymfocyty z lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z T lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z leukocytů (%)
D+1	0,09	0,11	0,36	0,03	0,01
D+7	1,85	1,92	3,01	1,04	1,12
D+15	10,08	10,67	6,11	15,32	7,04
D+30	3,10	3,12	1,89	4,14	1,21

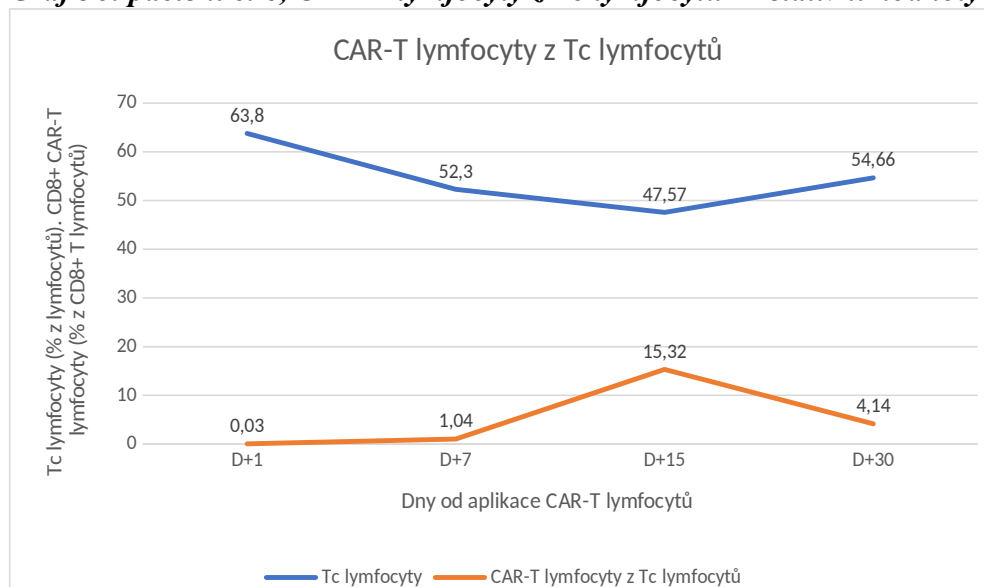
Graf 34: pacient č. 6, CAR-T lymfocyty z lymfocytů – relativní hodnoty



Graf 35: pacient č. 6, CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů – relativní hodnoty



Graf 36: pacient č. 6, CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů – relativní hodnoty



Dynamika expanze CAR-T lymfocytů je u pacientky č. 6 odlišná pouze v posunuté expanzi, jinak se opět podobá ostatním pacientům. První den po aplikaci bylo pozorováno malé množství CAR-T lymfocytů, nejvyšších hodnot CAR-T lymfocytů bylo dosaženo až 15. den od aplikace, kdy následovalo období rychlého poklesu, období perzistence nebylo detekováno z důvodu nízkého počtu sledovaných dní od aplikace, pacientka byla sledována pouze do 30. dne od aplikace.

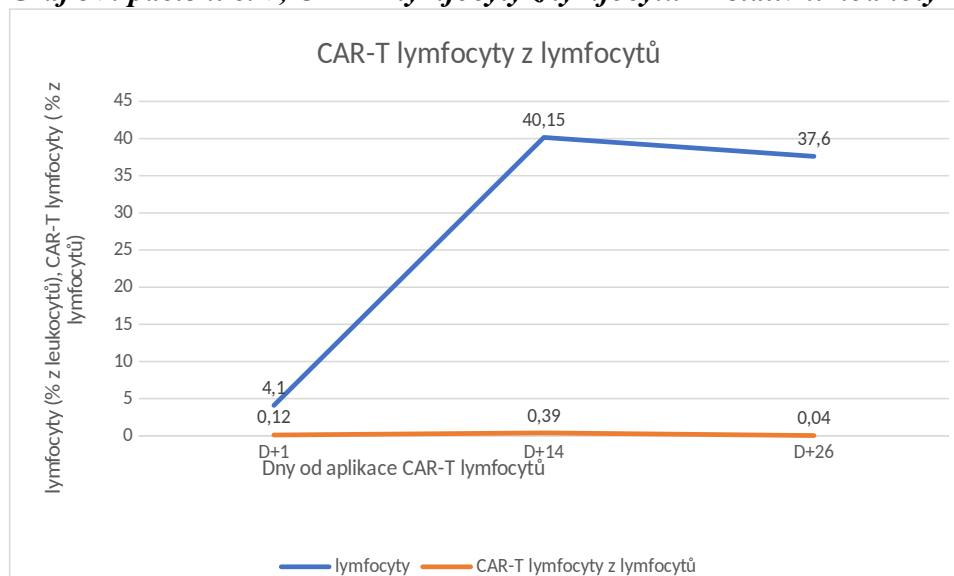
8.8 Pacient č. 7

Tabulka 11: výsledky pacienta č. 7

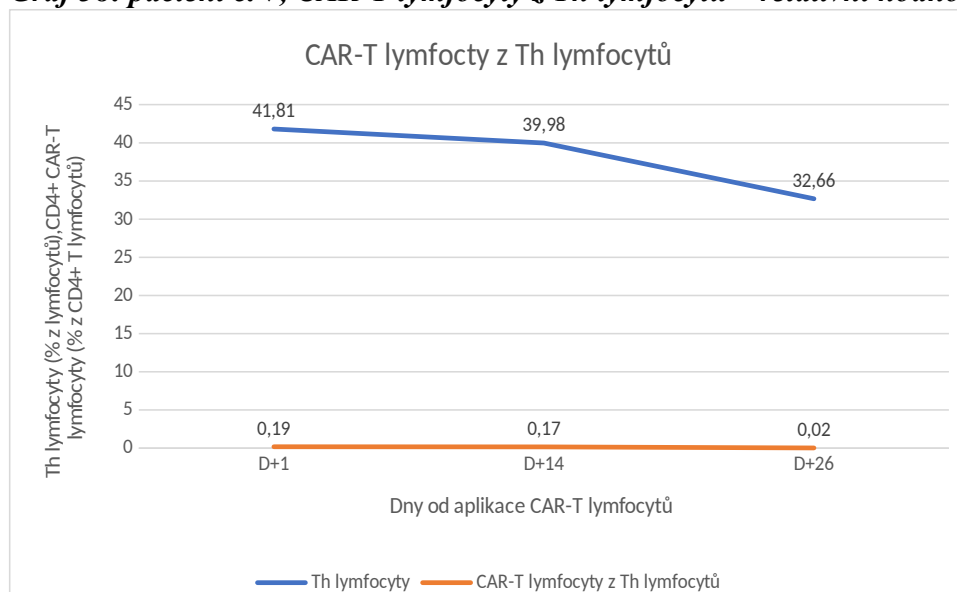
Den po aplikaci	Lymfocyty (% z leukocytů)	T lymfocyty (% z lymfocytů)	B lymfocyty (% z lymfocytů)	Th lymfocyty (% z lymfocytů)	Tc lymfocyty (% z lymfocytů)	Leukocyty (% z materiálu)	Absolutní počet buněk na μ l krve
D+1	4,10	92,57	0	41,81	53,94	2,64	0,13
D+14	40,15	85,79	0	39,98	44,96	11,61	16,30
D+26	37,60	85,77	0	32,66	51,42	11,14	2,40

Den po aplikaci	CAR-T lymfocyty z lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z T lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů (%)	CAR-T lymfocyty z leukocytů (%)
D+1	0,12	0,13	0,19	0,07	0,01
D+14	0,39	0,45	0,17	0,69	0,12
D+26	0,04	0,05	0,02	0,07	0,03

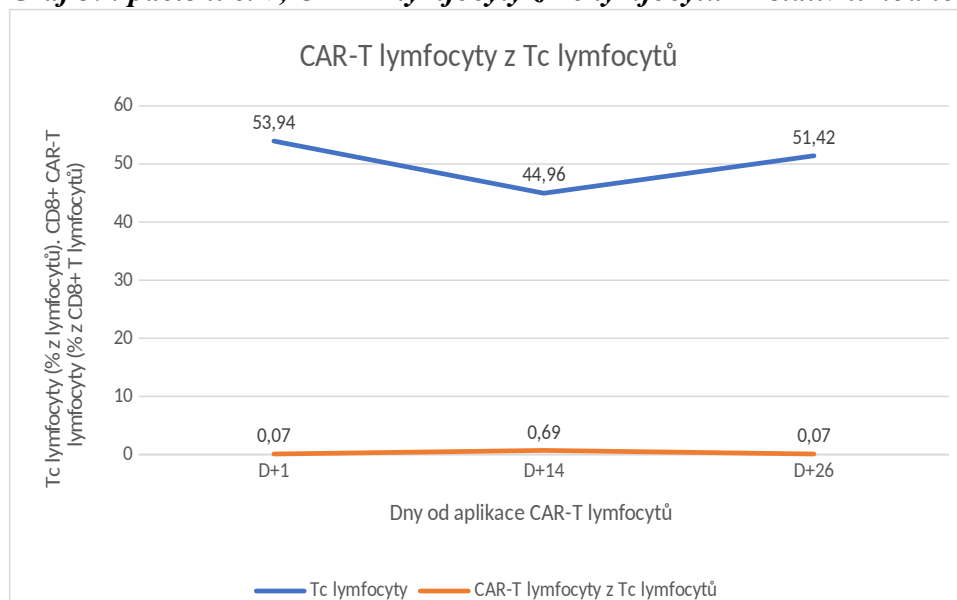
Graf 37: pacient č. 7, CAR-T lymfocyty z lymfocytů – relativní hodnoty



Graf 38: pacient č. 7, CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů – relativní hodnoty



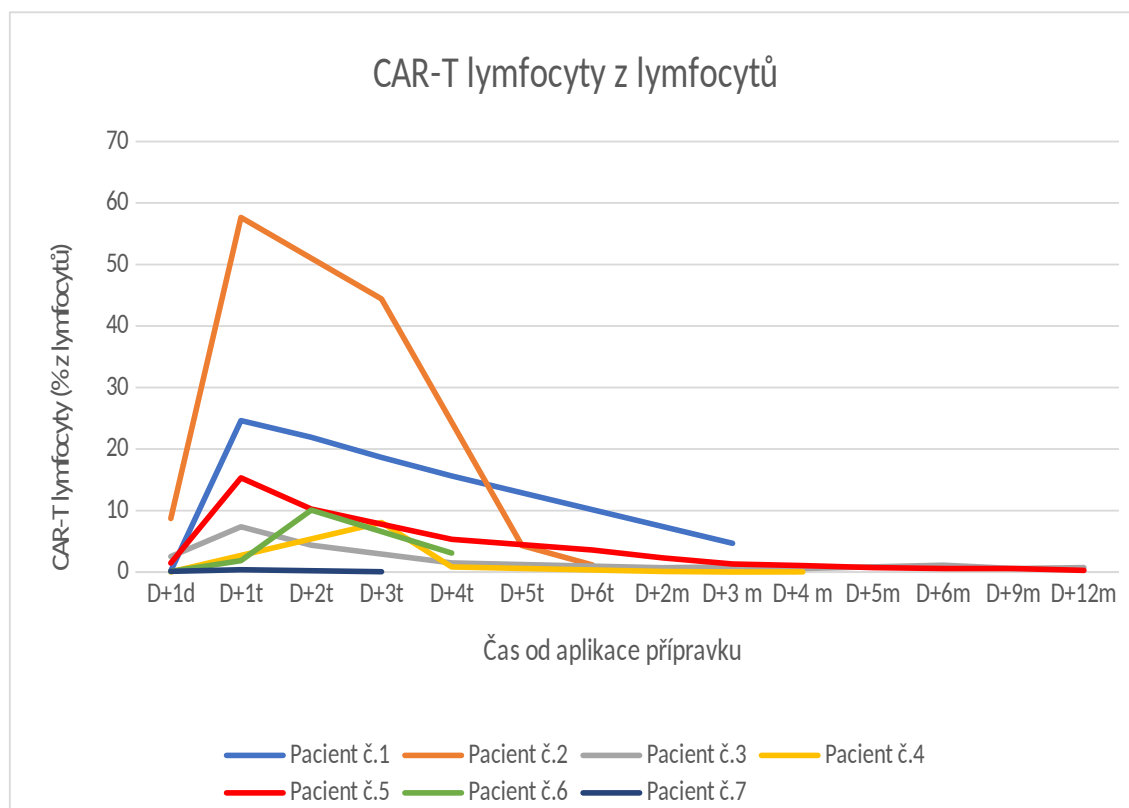
Graf 39: pacient č. 7, CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů – relativní hodnoty



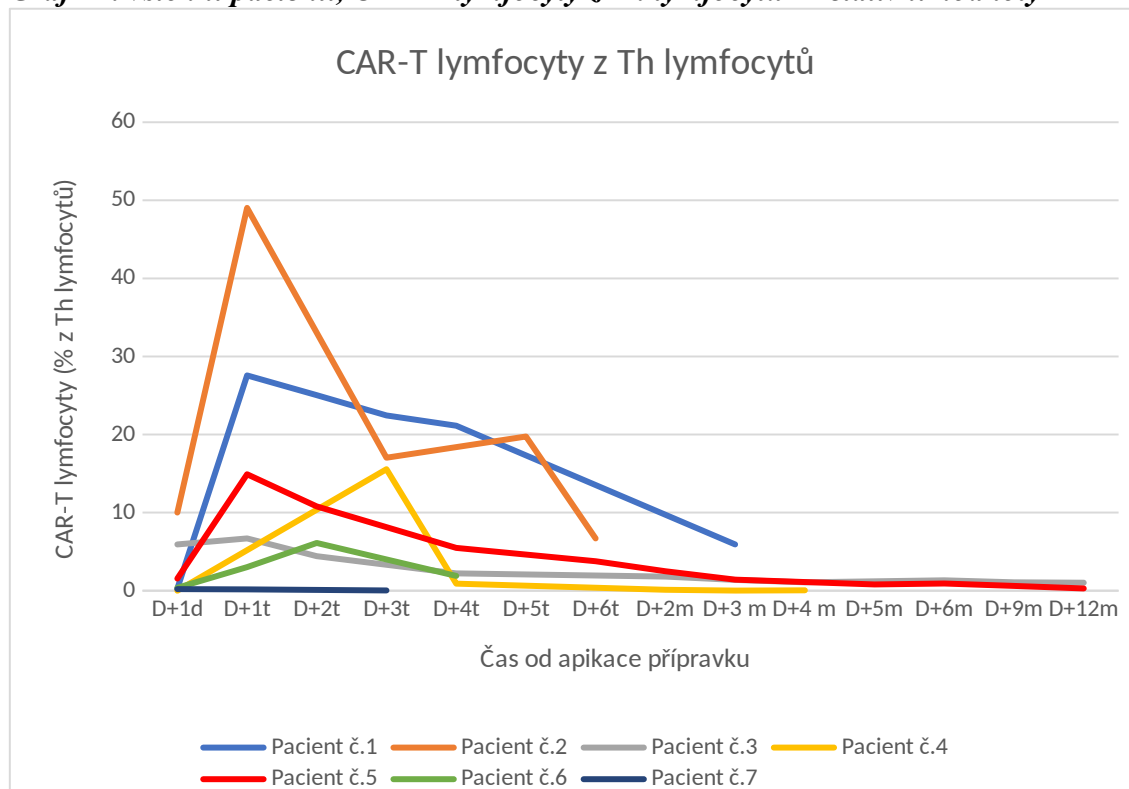
U pacienta č. 7 bylo obtížné hodnotit průběh expanze CAR-T lymfocytů z důvodu krátkého času sledování, k dispozici byly pouze tři časové úseky v průběhu jednoho měsíce. Bylo ovšem zajímavé, že ani po 26 dnech od aplikace přípravku nebylo dosaženo expanze CAR-T lymfocytů a hodnoty CAR-T lymfocytů byly prokázány pouze ve velmi malých hodnotách, které nedosahovaly ani 1 % z lymfocytů.

8.9 CAR-T lymfocyty v čase u všech pacientů

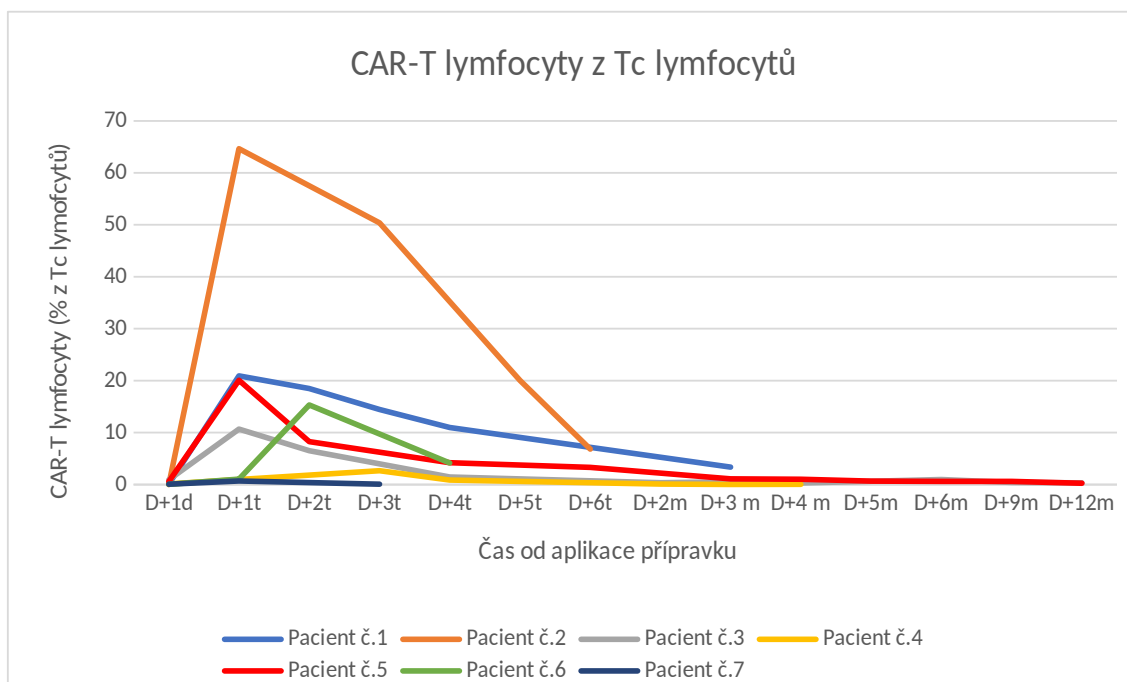
Graf 40: všichni pacienti, CAR-T lymfocyty z lymfocytů – relativní hodnoty



Graf 41: všichni pacienti, CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů – relativní hodnoty

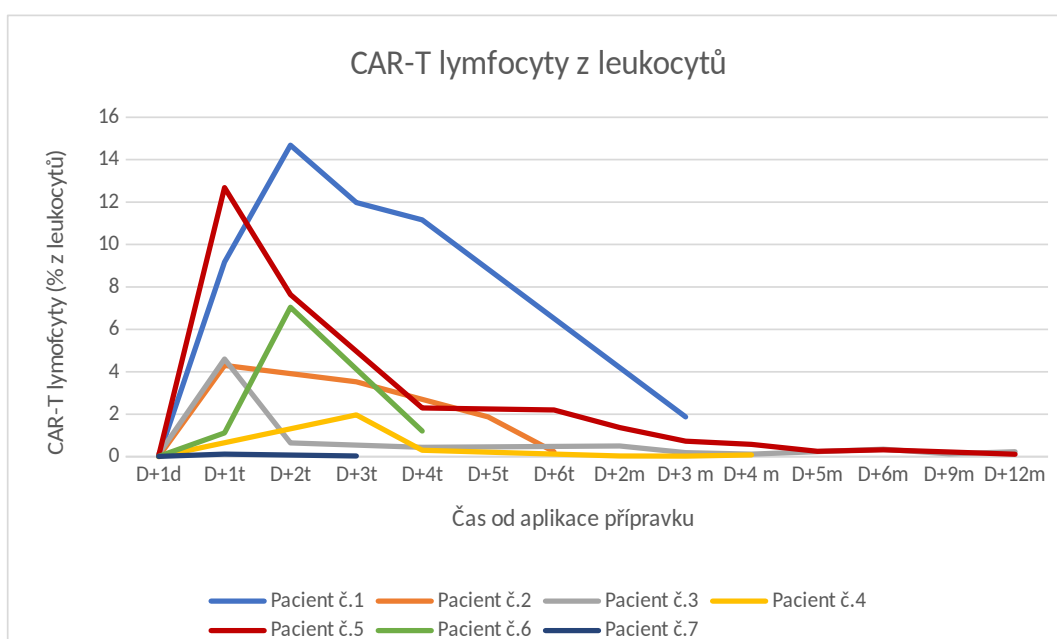


Graf 42: všichni pacienti, CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů – relativní hodnoty



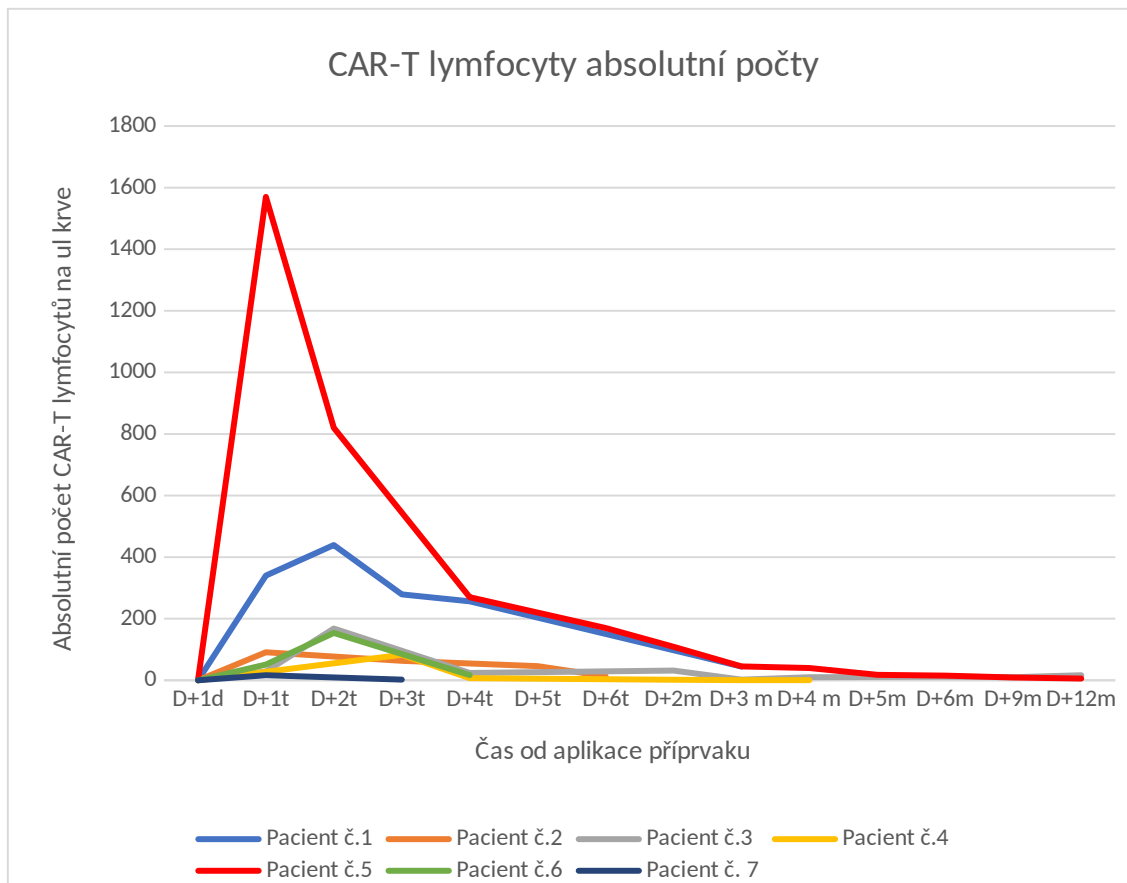
Dynamika expanze CAR-T lymfocytů z populace lymfocytů, Th lymfocytů a Tc lymfocytů byla u většiny pacientů podobná. K mnohonásobně největší expanzi CAR-T lymfocytů v relativních hodnotách došlo u pacienta č. 2. Naopak nejmenší počet CAR-T lymfocytů byl zaznamenán u pacienta č. 7, kde k žádné expanzi nedošlo. U čtyř pacientů (tedy 57 %) proběhlo období expanze v prvním týdnu od podání, jedná se tedy o nejčastější dobu expanze CAR-T lymfocytů v relativním počtu.

Graf 43: všichni pacienti, CAR-T lymfocyty z leukocytů – relativní hodnoty



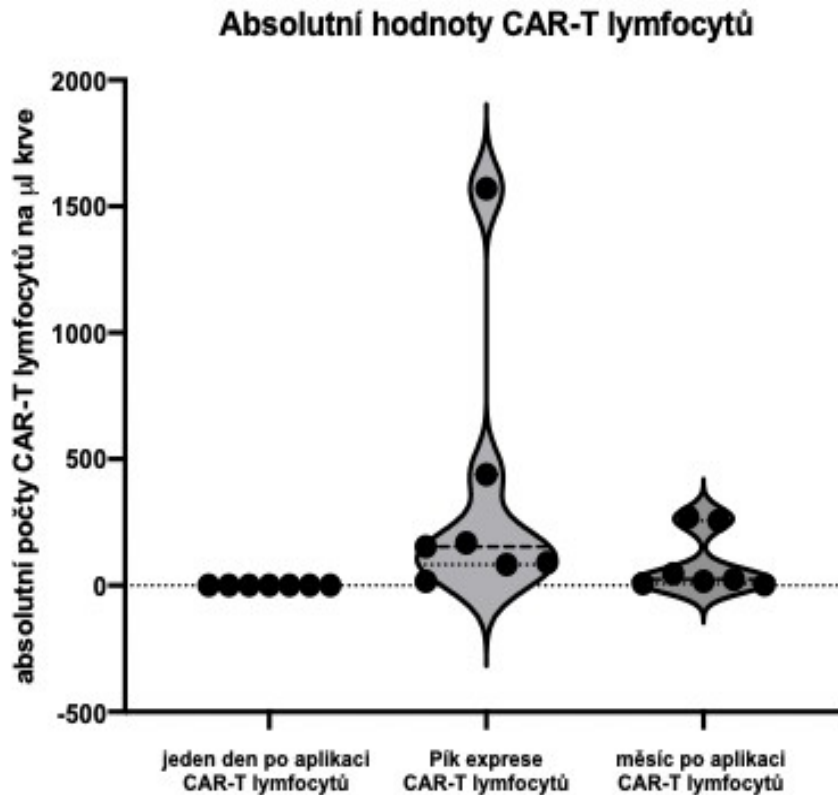
K nejvyšší expanzi CAR-T lymfocytů z populace leukocytů v relativních hodnotách došlo u pacienta č. 1, druhý nejvyšší počet byl zaznamenán u pacientky č. 5, která má i nejvyšší počet CAR-T lymfocytů v absolutních hodnotách. Nejčastější vrchol expanze byl zaznamenán v prvním týdnu od podání.

Graf 44: všichni pacienti, absolutní počty CAR-T lymfocytů



K mnohonásobně největší expanzi CAR-T lymfocytů v absolutních hodnotách došlo u pacientky č. 5, nejnižší absolutní počet CAR-T lymfocytů měl pacient č. 7, jako tomu bylo v relativních hodnotách. Naopak pacient č. 2, který měl nejvyšší relativní počty CAR-T lymfocytů, měl absolutní hodnoty CAR-T lymfocytů jedny z nejnižších. U tří pacientů byl zaznamenán vrchol expanze v prvním týdnu od podání, u dalších tří pacientů byl vrchol expanze zaznamenán druhý týden od podání přípravku.

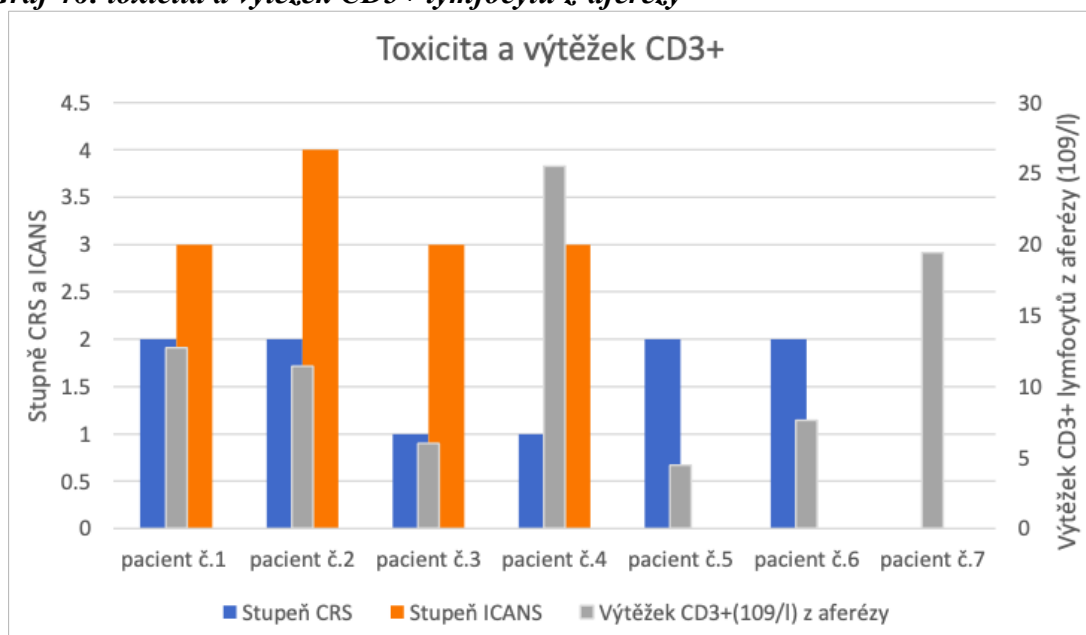
Graf 45: absolutní hodnoty CAR-T lymfocytů, violin graf



Pro vizualizaci distribuce dat expanze CAR-T lymfocytů (v absolutních hodnotách) u celé kohorty pacientů byl použit houslový graf (violin plot), který poskytuje detailnější představu o tvaru rozdělení. Na grafu je zaznamenán počet CAR-T lymfocytů v absolutních hodnotách po jednom dnu od aplikace přípravku, dále v době největší expanze CAR-T lymfocytů, tedy v období jednoho nebo dvou týdnů od aplikace v závislosti na konkrétním pacientovi, a měsíc po aplikaci přípravku.

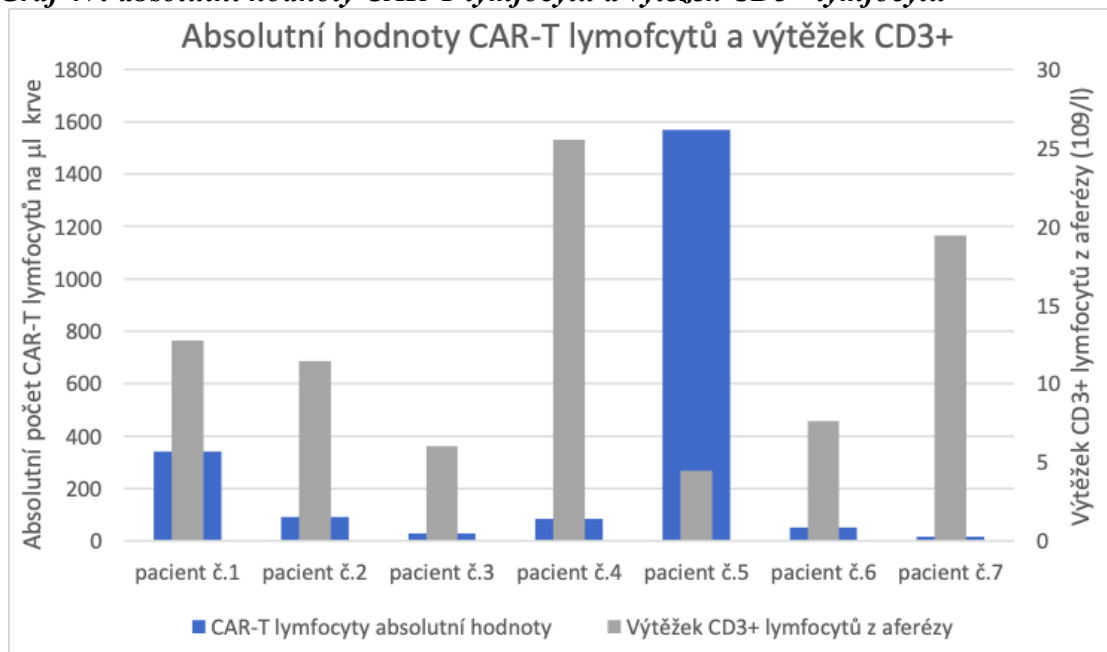
8.10 Výtěžek CD3+ lymfocytů z aferézy

Graf 46: toxicita a výtěžek CD3+ lymfocytů z aferézy



Při léčbě CAR-T lymfocyty se šest pacientů potýkalo s komplikacemi toxicity CRS a ICANS. V grafu č. 29 je graficky znázorněna souvislost mezi stupněm toxicity a výtěžkem CD3+ buněk z provedené aferézy. Hypotéza o možné souvislosti stupně toxicity s množstvím CD3+ buněk získaných z aferézy se nepotvrdila.

Graf 47: absolutní hodnoty CAR-T lymfocytů a výtěžek CD3+ lymfocytů



Na grafu č. 30 je znázorněno porovnání expanze absolutního počtu CAR-T lymfocytů v prvním týdnu s výtěžkem CD3+ ($10^9/l$) lymfocytů z aferézy u jednotlivých pacientů. Dle grafu je znatelné, že výtěžek CD3+ lymfocytů z aferézy nemá vliv na míru expanze CAR-T lymfocytů v prvním týdnu, jelikož pacient s nejvyšší expanzí CAR-T lymfocytů má nejnižší výtěžek CD3+ lymfocytů, u ostatních pacientů taktéž není žádná zjevná souvislost.

9. DISKUSE

Ve své diplomové práci jsem se zabývala tématem terapie pomocí CAR-T lymfocytů, která je využívána při léčbě hematologických malignit. Cílem práce bylo přinést základní informace o hematologických malignitách, jejich diagnostice a léčbě, o terapii CAR-T lymfocyty, jejich historii, výrobě, klinickému využití, nežádoucích účincích a jejich stanovení. Dalším cílem práce bylo sledování populací lymfocytů a CAR-T lymfocytů v průběhu času u pacientů, kteří byli léčeni ve FN Hradec Králové. Následným cílem práce bylo ověřit vhodnost metody stanovení.

Hematologické malignity jsou závažným zdravotním problémem, vyskytují se u všech věkových kategorií bez ohledu na pohlaví. Přesná příčina vzniku onemocnění nebyla doposud zcela objasněna. Klasická terapie hematologických malignit zahrnuje především radioterapii a chemoterapii. Existují pacienti, kterým tyto metody léčby nedokáží pomoci, proto jsou vyvíjeny nové metody léčby, jakou jsou například cílené terapie. Do této skupiny patří také terapie CAR-T lymfocyty.

CAR-T lymfocyty začaly být zkoumány v 80. letech dvacátého století. První návrh CAR-T lymfocytu vznikl v roce 1989 imunologem Zeligem Eshharem (Gross G, 1989). Významným okamžikem byl rok 2017, kdy byl americkou institucí Food and Drug Administration schválen první komerční preparát CAR-T lymfocytů ke klinickému použití, Kymriah. (Hrabovský, 2020). Od té doby bylo schváleno několik dalších preparátů a neustále probíhají další studie, které mají za cíl zlepšit účinnost přípravků a snížit nežádoucí účinky, které činí velké problémy. Terapie pomocí CAR-T lymfocytů je v klinické praxi využívána u hematologických malignit, především cílí na antigen CD19. Po úspěších v této oblasti jsou výzkumy prováděny také v souvislosti se solidními nádory.

Ve své práci prezentuji výsledky sedmi pacientů, kteří byli ve věku od 51 do 73 let a léčili se s diagnózou B-NHL, konkrétně DLBCL. Pacientům byl podáván přípravek Kymriah nebo Yescarta. Ke stanovení počtu CAR-T lymfocytů a jejich subpopulací byla využívána metoda průtokové cytometrie na cytometru Navios 10 (Bekman Coulter) s následným vyhodnocením dat v programu Kaluza C 1.1 (Beckman Coulter). Pro stanovení byly použity vzorky plné krve od jednotlivých pacientů. Pro určení subpopulace lymfocytů byla použita zkumavka s předem připravenými sušenými

reagenciemi od firmy Exbio. Pro stanovení CAR-T lymfocytů byla využita přímá detekce pomocí protilátky antiFMC63 scFv od firmy Acro Biosystems.

U sedmi pacientů byla sledována dynamika expanze lymfocytů, CAR-T lymfocytů a jejich subpopulací v průběhu času. Sledovaná dynamika expanze byla u většiny pacientů klasická. Bylo tedy pozorováno období rychlé expanze, následovalo období kontrakce a následně perzistence. Pouze u pacienta č. 7 nenastala expanze a hodnoty CAR-T lymfocytů nedosahovaly ani jednoho procenta z lymfocytů. Míra expanze byla u jednotlivých pacientů výrazně individuální a nebyl nalezen jednotný trend. Den, kdy došlo k nejvyšší expanzi se u pacientů také mírně lišil, ovšem všichni pacienti se pohybovali v rozmezí jednoho až dvou týdnů od aplikace. Nejčastěji byl pík CAR-T lymfocytů (v relativních hodnotách) pozorován po prvním týdnu od aplikace preparátu, kdy následně došlo k ústupu počtu CAR-T lymfocytů. U dvou pacientek bylo i po roce od podání možno detekovat malé množství CAR-T lymfocytů, byl tedy pozorován konstantní pokles. Pozorování dynamiky expanze také provedli autoři Peinelt et al., kteří dosáhli podobných výsledků, pouze s rozdílem posunutého píku expanze na dvanáctý den od aplikace přípravku Kymriah. Rozdílem může být odlišnost sledované populace, jelikož autoři Peinelt et al. sledovali populaci 79 dětí a mladých dospělých ve věku od 3 do 21 let, zatímco tato práce se věnovala sledování dospělých pacientů.

Bylo provedeno sledování subpopulací T lymfocytů a CAR-T lymfocytů. U jednotlivých pacientů byly zaznamenány velké rozdíly. U některých pacientů výrazně převažovaly Th lymfocyty (CD4+) a u některých Tc lymfocyty (CD8+), totéž platilo i pro hodnocení CAR-T lymfocytů z Th a Tc lymfocytů. Nebyla zde pozorována žádná souvislost s expanzí CAR-T lymfocytů, účinností terapie a výskytem nežádoucích účinků, to ovšem může souviset s velmi malým vzorkem sedmi pacientů.

Dle klinických informací se pacienti v souvislosti s léčbou CAR-T lymfocyty potýkali s nežádoucími účinky, konkrétně s CRS a ICANS. Pouze u pacienta č. 7 nebyly žádné nežádoucí účinky zaznamenány, to ovšem může souviset s faktem, že u pacienta nenastala expanze CAR-T lymfocytů, a také s krátkou dobou pozorování pacienta (pouze do D+26). U ostatních pacientů došlo k rozvoji CRS 1.-2. stupně, CRS 3.-4. stupně nebyl pozorován u žádného pacienta. ICANS se kromě pacienta č. 7 neobjevil u dalších dvou pacientů (č.6 a č.7), ostatní pacienti měli stupeň 3-4. Všichni pacienti u kterých se vyskytl ICANS, měli taktéž CRS. Tato souvislost se vyskytla taktéž ve studii

autorů Santomaso et al., 2018. Sledování rozvoje CRS a ICANS je využíváno také jako hodnocení účinnosti terapie CAR-T lymfocytů, kdy rozvoj nežádoucích účinků je známkou účinnosti terapie, respektive expanze CAR-T lymfocytů. Toto tvrzení lze demonstrovat na pacientovi č. 7, u kterého neproběhl rozvoj CRS ani ICAN, jelikož u něho neproběhla expanze CAR-T lymfocytů.

Hypotéza, zda vyšší výtěžek CD3+ buněk z aferézy souvisí s větším rizikem rozvoje toxicity CRS a ICANS se nepotvrdila. Pacient č. 4, který měl největší výtěžek CD3+ buněk z aferézy (tedy $25,51 \times 10^9/l$) neprodělal nejvyšší stupně toxicity z pozorovaných pacientů. Nejvyšší stupně toxicity CRS i ICANS byly zaznamenány u pacienta č. 2 s hodnotou $11,44 \times 10^9/l$ CD3+ buněk z aferézy. Dále hypotéza, zda souvisí výtěžek CD3+ buněk z aferézy s expanzí CAR-T lymfocytů se taktéž nepotvrdila. Pacient č. 5 s nejvyšší expanzí CAR-T lymfocytů v absolutních hodnotách měl nejnižší výtěžek CD3+ buněk z aferézy, u ostatních pacientů také nebyl pozorován žádný trend. Bylo provedeno také srovnání nežádoucích účinků toxicity s expanzí CAR-T lymfocytů v absolutních hodnotách. U tohoto pozorování opět nebyla potvrzena zjevná souvislost.

Porovnání toxicity u jednotlivých přípravků CAR-T lymfocytů není příliš optimální z důvodu nízkého počtu pacientů i nepoměru v četnosti podání. Pacient č. 2, u kterého byl podán preparát Yescarta, měl nejvyšší stupeň toxicity ze sledovaných pacientů. Naopak nejnižší stupně toxicity byly zaznamenány u pacientů č. 5 a 6, (vyjma pacienta č. 7, u kterého neproběhla expanze CAR-T lymfocytů), u kterých byl podán přípravek Kymriah. Tyto výsledky se shodují s výsledky autorů Bachy et al., kteří porovnávali toxicitu CRS a ICANS u přípravků Kymriah a Yescarta u 809 pacientů s DLBCL. Došli k závěru, že u přípravku Yescarta byla zaznamenána vyšší toxicita, než při podání přípravku Kymriah.

Pro hodnocení účinnosti terapie pomocí CAR-T lymfocytů lze využít hodnoty B lymfocytů v krvi pacientů. Využité preparáty CAR-T lymfocytů byly cílené proti antigenu CD19, který se vyskytuje na B lymfocytech. Aplazie B lymfocytů je cílovým účinkem terapie anti CD19 CAR-T lymfocyty, počet B lymfocytů je tedy funkčním markerem perzistence CAR-T lymfocytů. U všech sedmi pacientů po celou dobu sledování nebyly detekovány žádné B lymfocyty. V tomto ohledu se tedy terapie jevila jako úspěšná, byť dle klinických informací nedošli všichni pacienti do kompletní remise. Relaps nebo progres DLBCL po terapii CAR-T lymfocyty je nejdůležitějším

rizikem, který je potřeba v budoucnu řešit. Omezená aktivita CAR-T lymfocytů, ztráta cílového antigenu nebo například mikroprostředí nádoru mohou být možnými důvody nízké účinnosti. K dosažení lepší odpovědi na terapii CAR-T lymfocyty je třeba dalších studií.

V ČR zatím nebyla prezentována žádná studie hodnotící sledování CD19 CAR-T lymfocytů v čase nebo studie hodnotící bezpečnost a účinnost terapie CD19 CAR-T lymfocytů u pacientů s B-NHL. Aktuálně ovšem probíhá nábor do studie NCT05054257 probíhající na ÚHKT (ČR), která se bude věnovat sledování účinnosti CD19 CAR-T lymfocytů u pacientů s relabující/refrakterní ALL a NHL. Předpokládaný termín dokončení studie je plánován na 1. června 2028. (*ClinicalTrials.Gov*, n.d.)

Metoda stanovení CAR-T lymfocytů pomocí průtokové cytometrie se ukázala jako vhodná a citlivá, jelikož i po roce od podání preparátů bylo možno u dvou pacientek sledovat malé množství CAR-T lymfocytů. Výhoda metody je v relativně snadné proveditelnosti a také v rychlosti stanovení, které může být provedeno do dvou hodin. Metoda se pro svou univerzálnost a dostupnost hodí pro každou cytometrickou laboratoř.

Terapie CAR-T lymfocyty prokázala velký potenciál při léčbě hematologických onemocnění u pacientů s relabujícími/refrakterními typy hematologických malignit z B lymfocytů, kterým konvenční léčba nemůže pomoci. Jelikož se u terapie vyskytují mnohá omezení i vzhledem ke složitosti a velké finanční nákladnosti terapie, důležitost dalšího sledování pacientů léčených touto terapií v klinické praxi je velmi žádoucí, tak jako studium nových konstruktů CAR a objasnění mechanismů nádorového bujení nebo například vzniku nežádoucích účinků.

10. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo prezentovat informace o hematologických malignitách a CAR-T lymfocytech. Praktickým cílem bylo pozorování CAR-T lymfocytů v čase u jednotlivých pacientů se vztažením na nežádoucí účinky a výtěžek CD3+ lymfocytů z aferézy.

Bylo provedeno sledování CD19 CAR-T lymfocytů u sedmi pacientů s B-NHL. Byla zaznamenána typická dynamika expanze CAR-T lymfocytů s obdobím rychlé expanze, kontrakce a nakonec nastala fáze perzistence, kdy počty CAR-T lymfocytů klesaly v průběhu měsíců. Pouze u jednoho pacienta nenastala expanze CAR-T lymfocytů. U všech pacientů po celou dobu sledování byly pozorovány nulové hodnoty B lymfocytů, což ukazuje na účinnost anti-CD19 CAR-T lymfocytů u B-NHL. I přes tento fakt nedošli všichni pacienti kompletní remise. U pacientů byly hojně pozorovány nežádoucí účinky CRS a ICANS, ovšem nesouvisely s mírou expanze CAR-T lymfocytů ani s výtěžkem CD3+ lymfocytů z aferézy. U všech pacientů, u kterých se vyskytl ICANS, se také vyskytl CRS. Míra expanze CAR-T lymfocytů byla silně individuální a také neměla vliv na účinnost terapie.

U všech pacientů bylo možné prokázat CAR-T lymfocyty. U dvou pacientek byly CAR-T lymfocyty detekovány i rok od aplikace preparátu. Metoda průtokové cytometrie s využitím zkumavky s připravenými protilátkami od firmy Exbio a použitím protilátky antiFMC63 scFv od firmy Acro Biosystems se ukázala jako vhodná metoda pro stanovení anti-CD19 CAR-T lymfocytů z plné krve v klinické praxi.

11. POUŽITÉ ZKRATKY

ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
AML	Akutní myeloidní leukémie
BCMA	B-cell maturation antigen
BCR	B buněčný receptor
BTK	Brutonova tyrozinináza
CLL	Chronická lymfocytární leukémie
CML	Chronická myeloidní leukémie
CRP	C reaktivní protein
CRS	Syndrom uvolnění cytokinů, cytokine release syndrome
DLBCL	Difuzní velkobuněčný lymfom
FL	Folikulární lymfom
FSC	Přímý rozptyl, forward scatter
HL	Hodgkinův lymfom
ICANS	Immune Effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome
ITAM	Imunoreceptor tyrosin-based activation motif
MCL	Lymfom z pláštěvých buněk, mantle-cell lymphoma
MDS	Myelodysplastický syndrom
MHC	Major histocompatibility complex
MM	Mnohočetný myelom
NHL	Non-Hodgkinův syndrom
ROR1	Tyrosine kinase-like orphan receptor
scFv	Jednořetězcový variabilní fragment, single-chain variable fragment
SSC	Boční rozptyl, side scatter
TALEN	Transcription activator-like effector nucleasy
TCR	T buněčný receptor
TLS	Syndrom rozpadu nádoru, tumor lysis syndrome
TNF	Tumor nekrotizující faktor
TRUCK	T cell redirected for universal cytokine-mediated killing
ÚHKT	Ústav hematologie a krevní transfuze
V _H	Variabilní část těžkého řetězce

V_L

Variabilní část lehkého řetězce

12. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: schválené CAR preparáty.....	29
Tabulka 2: základní informace o pacientech.....	42
Tabulka 3: další informace o pacientech.....	42
Tabulka 4: složení sušených reagensů ve zkumavce firmy Exbio.....	43
Tabulka 5: výsledky pacienta č. 1.....	47
Tabulka 6: výsledky pacienta č. 2.....	49
Tabulka 7: výsledky pacienta č. 3.....	51
Tabulka 8: výsledky pacienta č. 4.....	53
Tabulka 9: výsledky pacienta č. 5.....	55
Tabulka 10: výsledky pacienta č. 6.....	58
Tabulka 11: výsledky pacienta č. 7.....	60

13. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: domény CAR-T lymfocytů.....	19
Obrázek 2: generace CAR.....	21
Obrázek 3: schéma přípravy CAR-T lymfocytů.....	26
Obrázek 4: schéma průtokového cytometru.....	41
Obrázek 5: dynamika expanze CAR-T lymfocytů.....	45

14. SEZNAM GRAFŮ

Graf 17: věk pacientů s novotvary mízní a krvetvorné tkáně v ČR v letech 2014–2018	15
Graf 18: dynamika expanze CAR-T lymfocytů.....	46
Graf 19: pacient č. 1, CAR-T lymfocyty z lymfocytů – relativní hodnoty.....	47
Graf 20: pacient č. 1, CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů – relativní hodnoty.....	48
Graf 21: pacient č. 1, CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů – relativní hodnoty.....	48
Graf 22: pacient č. 2, CAR-T lymfocyty z lymfocytů – relativní hodnoty.....	49
Graf 23: pacient č. 2, CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů – relativní hodnoty.....	50
Graf 24: pacient č. 2, CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů – relativní hodnoty.....	50
Graf 25: pacient č. 3, CAR-T lymfocyty z lymfocytů – relativní hodnoty.....	51
Graf 26: pacient č. 3, CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů – relativní hodnoty.....	52
Graf 27: pacient č. 3, CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů – relativní hodnoty.....	52
Graf 28: pacient č. 4, CAR-T lymfocyty z lymfocytů – relativní hodnoty.....	53
Graf 29: pacient č. 4, CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů – relativní hodnoty.....	54
Graf 30: pacient č. 4, CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů – relativní hodnoty.....	54
Graf 31: pacient č. 5, CAR-T lymfocyty z lymfocytů – relativní hodnoty.....	56
Graf 32: pacient č. 5, CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů – relativní hodnoty.....	56
Graf 33: pacient č. 5, CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů – relativní hodnoty.....	57
Graf 34: pacient č. 6, CAR-T lymfocyty z lymfocytů – relativní hodnoty.....	58
Graf 35: pacient č. 6, CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů – relativní hodnoty.....	59
Graf 36: pacient č. 6, CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů – relativní hodnoty.....	59
Graf 37: pacient č. 7, CAR-T lymfocyty z lymfocytů – relativní hodnoty.....	60
Graf 38: pacient č. 7, CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů – relativní hodnoty.....	61
Graf 39: pacient č. 7, CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů – relativní hodnoty.....	61
Graf 40: všichni pacienti, CAR-T lymfocyty z lymfocytů – relativní hodnoty.....	62
Graf 41: všichni pacienti, CAR-T lymfocyty z Th lymfocytů – relativní hodnoty.....	62
Graf 42: všichni pacienti, CAR-T lymfocyty z Tc lymfocytů – relativní hodnoty.....	63
Graf 43: všichni pacienti, CAR-T lymfocyty z leukocytů – relativní hodnoty.....	63
Graf 44: všichni pacienti, absolutní počty CAR-T lymfocytů.....	64
Graf 45: absolutní hodnoty CAR-T lymfocytů, violín graf.....	65
Graf 46: toxicita a výtěžek CD3+ lymfocytů z aferézy.....	66
Graf 47: absolutní hodnoty CAR-T lymfocytů a výtěžek CD3+ lymfocytů.....	66

15. POUŽITÁ LETERATURA

1. Abramson, J. S., Gordon, L. I., Palomba, M. L., Lunning, M. A., Arnason, J. E., Forero-Torres, A., Wang, M., Maloney, D. G., Sehgal, A., Andreadis, C., Purev, E., Solomon, S. R., Ghosh, N., Albertson, T. M., Xie, B., Garcia, J., & Siddiqi, T. (2018). Updated safety and long term clinical outcomes in TRANSCEND NHL 001, pivotal trial of lisocabtagene maraleucel (JCAR017) in R/R aggressive NHL. "https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_SUPPL.7505" https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_SUPPL.7505
2. Adam, Z., Vorlíček, Jiří, Krejčí, M., & et. al. (2011). *Obecná onkologie*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-796-7
3. Adam, Z., & Vorlíček, J. (2004). *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob*. Praha: Grada. ISBN 8024708965
4. Ahmad, U., Khan, Z., Ualiyeva, D., Amissah, O. B., Noor, Z., Khan, A., Zaman, N., Khan, M., Khan, A., & Ali, B. (2022). Chimeric antigen receptor T cell structure, its manufacturing, and related toxicities; A comprehensive review. *Advances in Cancer Biology - Metastasis*, 4, 100035. <https://doi.org/10.1016/J.ADCANC.2022.100035>
5. Bachy, E., Le Gouill, S., Di Blasi, R., Sesques, P., Manson, G., Cartron, G., Beauvais, D., Roulin, L., Gros, F. X., Rubio, M. T., Bories, P., Bay, J. O., Llorente, C. C., Choquet, S., Casasnovas, R. O., Mohty, M., Guidez, S., Joris, M., Loschi, M., ... Morschhauser, F. (2022). A real-world comparison of tisagenlecleucel and axicabtagene ciloleucel CAR T cells in relapsed or refractory diffuse large B cell lymphoma. *Nature Medicine*, 28(10), 2145.
6. <https://doi.org/10.1038/S41591-022-01969-Y>
7. Bauer, J., Bajčiová, V., Krajsová, I., Ryška, A., Říhová, B., Šťastný, Marek., & Uhlíř, Jan. (2018). *Imunologie a imunoterapie nádorů : současné poznatky snadno a rychle: Vol. 1*. Praha: Mladá fronta. ISBN 80-204-4944-2 https://books.google.com/books/about/Imunologie_a_imunoterapie_n%C3%A1dor%C5%AF.html?hl=cs&id=8in-xAEACAAJ
8. Bove, C., Arcangeli, S., Falcone, L., Camisa, B., El Khoury, R., Greco, B., De Lucia, A., Bergamini, A., Bondanza, A., Ciceri, F., Bonini, C., & Casucci, M. (2023). CD4 CAR-T cells targeting CD19 play a key role in exacerbating cytokine release syndrome, while maintaining long-term responses. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 11(1), e005878. <https://doi.org/10.1136/JITC-2022-005878>
9. Brudno, J. N., & Kochenderfer, J. N. (2019). Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Reviews*, 34, 45. <https://doi.org/10.1016/J.BLRE.2018.11.002>

10. Büchler, T., & kolektiv. (2017). *Speciální onkologie. Praha: Maxdorf jessenius*, 1. vydání. ISBN ISBN 978-80-7345-539-2).
11. Buqué, A., Bloy, N., Aranda, F., Castoldi, F., Eggermont, A., Cremer, I., Fridman, W. H., Fucikova, J., Galon, J., Marabelle, A., Spisek, R., Tartour, E., Zitvogel, L., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2015). Trial Watch: Immunomodulatory monoclonal antibodies for oncological indications. *Oncoimmunology*, 4(4), 15.
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1008814>
12. Cao, J. X., Wang, H., Gao, W. J., You, J., Wu, L. H., & Wang, Z. X. (2020). The incidence of cytokine release syndrome and neurotoxicity of CD19 chimeric antigen receptor–T cell therapy in the patient with acute lymphoblastic leukemia and lymphoma. *Cytotherapy*, 22(4), 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.01.015>
13. *CAR T Cells: Engineering Immune Cells to Treat Cancer - NCI*. (n.d.). National Cancer Institute. Retrieved February 13, 2023, from <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells>
14. Chattopadhyay, P. K., & Roederer, M. (2012). Cytometry: Today’s Technology and Tomorrow’s Horizons. *Methods (San Diego, Calif.)*, 57(3), 251.
<https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2012.02.009>
15. Chen, H. W., Liao, C. H., Ying, C., Chang, C. J., & Lin, C. M. (2006). Ex vivo expansion of dendritic-cell-activated antigen-specific CD4 + T cells with anti-CD3/CD28, interleukin-7, and interleukin-15: Potential for adoptive T cell immunotherapy. *Clinical Immunology*, 119(1), 21–31.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.11.003>
16. Chmielewski, M., Hombach, A. A., & Abken, H. (2014). Of CARs and TRUCKs: chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma. *Immunological Reviews*, 257(1), 83–90.
<https://doi.org/10.1111/IMR.12125>
17. *ClinicalTrials.gov*. (n.d.). Retrieved April 4, 2023, from <https://clinicaltrials.gov/>
18. *Definition of solid tumor - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI*. (n.d.). Retrieved March 23, 2023, from <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/solid-tumor>
19. DeVita, V. T., Lawrence, T. S., Rosenberg, S. A., & Hellman, S. (2022). *Devita, Hellman, and Rosenberg’s cancer principles and practice of oncology* (12th ed.). Lippincott Williams & Wilkins (LWW). ISBN 78-1975184742
20. Doubek, M., & Mayer, J. (2013). *Postupy diagnostiky a léčby leukemií a jejich infekčních komplikací u dospělých pacientů. Doporučení České leukemické skupiny – pro život (CELL)*. Česká leukemická skupina – pro život.
https://www.hematology.cz/wp-content/uploads/2021/09/guidelines_cell_2013.pdf

21. Erber, W. N. (2010). Diagnostic techniques in hematological malignancies. *Diagnostic Techniques in Hematological Malignancies*, 1–336. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511760273>
22. Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G., & Schindler, D. G. (1993). Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(2), 720–724. <https://doi.org/10.1073/PNAS.90.2.720>
23. Fečková Mihályová, J., Ďuraš, J., Zuchnická, J., Kaščák, M., & Hájek, R. (2016). Ibrutinib v hematookologii. *Klin Farmakol Farm*, 30(3), 8–14. www.klinickafarmakologie.cz
24. Folber, F., Cermanová, M., Horáček, J. M., & Kupsa, T. (2021). Léčba pacientů přípravkem buněčné terapie axikabtagen ciloleucel. *Klin Farmakol Farm*, 35(3), 56–60. www.klinickafarmakologie.cz56HLAVNÍTEMALéčbapacientůpřípravkembuněčnéterapieaxikabtagenciLoLeucel
25. Fraietta, J. A., Beckwith, K. A., Patel, P. R., Ruella, M., Zheng, Z., Barrett, D. M., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., McGettigan, S. E., Cook, D. R., Zhang, C., Xu, J., Do, P., Hulitt, J., Kudchodkar, S. B., Cogdill, A. P., Gill, S., Porter, D. L., Woyach, J. A., ... Maus, M. v. (2016). Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia. *Blood*, 127(9), 1117–1127. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2015-11-679134>
26. Görgün, G., Holderried, T. A. W., Zahrieh, D., Neuberg, D., & Gribben, J. G. (2005). Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(7), 1797–1805. <https://doi.org/10.1172/JCI24176>
27. Grigor, E. J. M., Fergusson, D., Kekre, N., Montroy, J., Atkins, H., Seftel, M. D., Daugaard, M., Presseau, J., Thavorn, K., Hutton, B., Holt, R. A., & Lalu, M. M. (2019). Risks and Benefits of Chimeric Antigen Receptor T-Cell (CAR-T) Therapy in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Transfusion Medicine Reviews*, 33(2), 98–110. <https://doi.org/10.1016/J.TMRV.2019.01.005>
28. Grover, N. S., Ivanova, A., Moore, D. T., Cheng, C. J. A., Babinec, C., West, J., Cavallo, T., Morrison, J. K., Buchanan, F. B., Bowers, E., Dittus, C., Beaven, A. W., Dotti, G., Serody, J. S., & Savoldo, B. (2021). CD30-Directed CAR-T Cells Co-Expressing CCR4 in Relapsed/Refractory Hodgkin Lymphoma and CD30+ Cutaneous T Cell Lymphoma. *Blood*, 138(Supplement 1), 742–742. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2021-148102>
29. Haso, W., Lee, D. W., Shah, N. N., Stetler-Stevenson, M., Yuan, C. M., Pastan, I. H., Dimitrov, D. S., Morgan, R. A., FitzGerald, D. J., Barrett, D. M., Wayne, A. S., MacKall, C. L., & Orentas, R. J. (2013). Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 121(7), 1165–1171. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2012-06-438002>

30. Hay, K. A., Hanafi, L. A., Li, D., Gust, J., Liles, W. C., Wurfel, M. M., López, J. A., Chen, J., Chung, D., Harju-Baker, S., Cherian, S., Chen, X., Riddell, S. R., Maloney, D. G., & Turtle, C. J. (2017). Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy. *Blood*, *130*(21), 2295–2306. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-06-793141>
31. Hombach, A. A., & Abken, H. (2011). Costimulation by chimeric antigen receptors revisited the T cell antitumor response benefits from combined CD28-OX40 signalling. *International Journal of Cancer*, *129*(12), 2935–2944. <https://doi.org/10.1002/IJC.25960>
32. Hořejší, V., & Bartůňková, J. (2005). *Základy imunologie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-7387-713-2
33. Hrabovský, Š. (2020). CAR T-lymfocyty: horká novinka v léčbě nádorů. *Vnitřní Lékařství*, *66*(7), 420–424. <https://doi.org/10.36290/VNL.2020.121>
34. 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. *Immunological Reviews*, *208*, 50–65.
35. <https://doi.org/10.1111/J.0105-2896.2005.00325.X>
36. Hynková, L., Šlampa, P., Burkoň, P., Čoupek, P., Čoupková, I., Doleželová, H., Garčicová, J., Gombošová, J., Hubnerová, P., Kazda, T., Kocmanová, E., Komínek, L., Krupa, P., Kudláček, A., Navrátilová, P., Novotný, T., Ondrová, B., Pospíšil, P., Princ, D., ... Tichá, H. (2012). *Základy radiační onkologie* (1st ed.). Masarykova univerzita. <https://www.muni.cz/vyzkum/publikace/1085864>
37. Jayaraman, J., Mellody, M. P., Hou, A. J., Desai, R. P., Fung, A. W., Pham, A. H. T., Chen, Y. Y., & Zhao, W. (2020). CAR-T design: Elements and their synergistic function. *EBioMedicine*, *58*, 102931. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102931>
38. Kagoya, Y., Tanaka, S., Guo, T., Anczurowski, M., Wang, C. H., Saso, K., Butler, M. O., Minden, M. D., & Hirano, N. (2018). A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nature Medicine*, *24*(3), 352. <https://doi.org/10.1038/NM.4478>
39. Katz, S. C., Point, G. R., Cunetta, M., Thorn, M., Guha, P., Espat, N. J., Boutros, C., Hanna, N., & Junghans, R. P. (2016). Regional CAR-T cell infusions for peritoneal carcinomatosis are superior to systemic delivery. *Cancer Gene Therapy*, *23*(5), 142. <https://doi.org/10.1038/CGT.2016.14>
40. Kelner, P. (2011). *Základy klinické onkologie*. Praha: Galén. ISBN 9788072627165

41. Kepp, O., Galluzzi, L., Martins, I., Schlemmer, F., Adjemian, S., Michaud, M., Sukkurwala, A. Q., Menger, L., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2011). Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Reviews*, 30(1), 61–69. <https://doi.org/10.1007/S10555-011-9273-4>
42. Koščík, M., & Mayer, J. (2021). *Národní hematoonkologický program České republiky*. https://www.hematology.cz/wp-content/uploads/2022/01/Narodni_hematoonkologicky_program_CR_2021-08-13.pdf
43. Lenka Doležalová. (2016). Cílená léčba u nádorových onemocnění krve. *Onkologie*, 231–236. <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2016/05/07.pdf>
44. Levine, B. L., Miskin, J., Wonnacott, K., & Keir, C. (2017). Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 4, 92. <https://doi.org/10.1016/J.OMTM.2016.12.006>
45. Li, Y., Huo, Y., Yu, L., & Wang, J. (2019). Quality Control and Nonclinical Research on CAR-T Cell Products: General Principles and Key Issues. *Engineering*, 5(1), 122–131. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2018.12.003>
46. Locke, F. L., Neelapu, S. S., Bartlett, N. L., Siddiqi, T., Chavez, J. C., Hosing, C. M., Ghobadi, A., Budde, L. E., Bot, A., Rossi, J. M., Jiang, Y., Xue, A. X., Elias, M., Aycock, J., Wieszorek, J., & Go, W. Y. (2017). Phase 1 Results of ZUMA-1: A Multicenter Study of KTE-C19 Anti-CD19 CAR T Cell Therapy in Refractory Aggressive Lymphoma. *Molecular Therapy*, 25(1), 285. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2016.10.020>
47. Lysák, D. (2015). Imunoterapie pomocí CAR T-lymfocytů. *Onkologie*, 9(1), 13–18. <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2015/01/05.pdf>
48. Ma, S., Li, X., Wang, X., Cheng, L., Li, Z., Zhang, C., Ye, Z., & Qian, Q. (2019). Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors. *International Journal of Biological Sciences*, 15(12), 2548. <https://doi.org/10.7150/IJBS.34213>
49. 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. *Nature Biotechnology*, 20(1), 70–75. <https://doi.org/10.1038/NBT0102-70>
50. Marinov, Iuri. (2008). *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*. Praha: Triton. ISBN 9788073871437
51. Marofi, F., Rahman, H. S., Achmad, M. H., Sergeevna, K. N., Suksatan, W., Abdelbasset, W. K., Mikhailova, M. V., Shomali, N., Yazdanifar, M., Hassanzadeh, A., Ahmadi, M., Motavalli, R., Pathak, Y., Izadi, S., & Jarahian, M. (2021). A Deep Insight Into CAR-T Cell Therapy in Non-Hodgkin Lymphoma: Application, Opportunities, and Future Directions. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.681984>

52. Maude, S. L., Laetsch, T. W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., Bader, P., Verneris, M. R., Stefanski, H. E., Myers, G. D., Qayed, M., de Moerloose, B., Hiramatsu, H., Schlis, K., Davis, K. L., Martin, P. L., Nemecek, E. R., Yanik, G. A., Peters, C., ... Grupp, S. A. (2018). Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 378(5), 439–448. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1709866>
53. Miao, L., Zhang, Z., Ren, Z., & Li, Y. (2021). Reactions Related to CAR-T Cell Therapy. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.663201>
54. Mihályová, J., Jelínek, T., Kaščák, M., Benková, K., Ďuraš, J., Demel, I., Kořístek, Z., & Hájek, R. (2022). Praktické aspekty terapie CAR-T lymfocyty. *Klinická Onkologie*, 35(1), 44–54. <https://doi.org/10.48095/CCKO202244>
55. Moghanloo, E., Mollanoori, H., Talebi, M., Pashangzadeh, S., Faraji, F., Hadjilooei, F., & Mahmoodzadeh, H. (2021). Remote controlling of CAR-T cells and toxicity management: Molecular switches and next generation CARs. *Translational Oncology*, 14(6). <https://doi.org/10.1016/J.TRANON.2021.101070>
56. *Monoclonal Anti-FMC63 Antibody, Mouse IgG1 (Y45) (HEK293) DMF Filed - ACROBiosystems*. (n.d.). Retrieved March 10, 2023, from <https://www.acrobiosystems.com/P3498-Monoclonal-Anti-FMC63-Antibody-Mouse-IgG1-%28Y45%29-%28HEK293%29-DMF-Filed.html>
57. *Monoklonální protilátka anti-FMC63 scFv, vektor konjugovaný s biotinem - Creative Biolabs*. (n.d.). Retrieved March 10, 2023, from <https://www.creative-biolabs.com/car-t/anti-fmc63-scfv-monoclonal-antibody-biotin-conjugated-92960.htm>
58. Neelapu, S. S., Locke, F. L., Bartlett, N. L., Lekakis, L. J., Miklos, D. B., Jacobson, C. A., Braunschweig, I., Oluwole, O. O., Siddiqi, T., Lin, Y., Timmerman, J. M., Stiff, P. J., Friedberg, J. W., Flinn, I. W., Goy, A., Hill, B. T., Smith, M. R., Deol, A., Farooq, U., ... Go, W. Y. (2017). Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, 377(26), 2531. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1707447>
59. Offner, S., Hofmeister, R., Romaniuk, A., Kufer, P., & Baeuerle, P. A. (2006). Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells. *Molecular Immunology*, 43(6), 763–771. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2005.03.007>
60. Otáhal P, & Trněný M. (2015). Současné možnosti imunoterapie nádorových onemocnění Current Approaches in Cancer Immunotherapy. *Klin Onkol*, 28(3), 3–105. <https://doi.org/10.14735/amko20153S105>

61. Pan, J., Niu, Q., Deng, B., Liu, S., Wu, T., Gao, Z., Liu, Z., Zhang, Y., Qu, X., Zhang, Y., Liu, S., Ling, Z., Lin, Y., Zhao, Y., Song, Y., Tan, X., Zhang, Y., Li, Z., Yin, Z., ... Tong, C. (2019). CD22 CAR T-cell therapy in refractory or relapsed B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 33(12), 2854–2866. <https://doi.org/10.1038/S41375-019-0488-7>
62. Park, J. H., Rivière, I., Gonen, M., Wang, X., Sénéchal, B., Curran, K. J., Sauter, C., Wang, Y., Santomasso, B., Mead, E., Roshal, M., Maslak, P., Davila, M., Brentjens, R. J., & Sadelain, M. (2018). Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 378(5), 449–459. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1709919>
63. Peinelt, A., Bremm, M., Kreyenberg, H., Cappel, C., Banisharif-Dehkordi, J., Erben, S., Rettinger, E., Jarisch, A., Meisel, R., Schlegel, P. G., Beck, O., Bug, G., Klusmann, J. H., Klingebiel, T., Huenecke, S., & Bader, P. (2022). Monitoring of Circulating CAR T Cells: Validation of a Flow Cytometric Assay, Cellular Kinetics, and Phenotype Analysis Following Tisagenlecleucel. *Frontiers in Immunology*, 13, 811. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.830773/BIBTEX>
64. Penka, M., & Tesařová, E. (2011). *Hematologie a transfuzní lékařství I: Hematologie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3459-0
65. Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A., & June, C. H. (2011). Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 365(8), 725. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1103849>
66. Powell, D. J., Brennan, A. L., Zheng, Z., Huynh, H., Cotte, J., & Levine, B. L. (2009). Efficient clinical-scale enrichment of lymphocytes for use in adoptive immunotherapy using a modified counterflow centrifugal elutriation program. *Cytotherapy*, 11(7), 923–935. <https://doi.org/10.3109/14653240903188921>
67. Preffer, F., & Dombkowski, D. (2009). Advances in Complex Multiparameter Flow Cytometry Technology: Applications in Stem Cell Research. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 76(5), 295. <https://doi.org/10.1002/CYTO.B.20480>
68. *První buněčná genová terapie nádoru ve FN Brno a ve střední Evropě. Pacient může jít domů - Fakultní nemocnice Brno*. (2019, December 20). <https://www.fnbrno.cz/prvni-bunecna-genova-terapie-nadoru-ve-fn-brno-a-ve-stredni-evrope-pacient-muze-jit-domu/t6731>
69. Qian, W., Zhao, A., Liu, H., Lei, W., Liang, Y., & Yuan, X. (2021). Safety and Efficacy of CD19 CAR-T Cells Co-Expressing IL-7 and CCL19 in Combination with Anti-PD-1 Antibody for Refractory/Relapsed DLBCL: Preliminary Data from the Phase IIb Trial (NCT04381741). *Blood*, 138(Supplement 1), 3843–3843. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2021-144523>

70. Rafiq, S., Hackett, C. S., & Brentjens, R. J. (2020). Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 17(3), 147–167. <https://doi.org/10.1038/S41571-019-0297-Y>
71. Ramos, C. A., Rouse, R., Robertson, C. S., Reyna, A., Narala, N., Vyas, G., Mehta, B., Zhang, H., Dakhova, O., Carrum, G., Kamble, R. T., Gee, A. P., Mei, Z., Wu, M. F., Liu, H., Grilley, B., Rooney, C. M., Heslop, H. E., Brenner, M. K., ... 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. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(12), 2727–2737. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2018.09.009>
72. Reynolds, J. C., del Vecchio, S., Sakahara, H., Lora, M. E., Carrasquillo, J. A., Neumann, R. D., & Larson, S. M. (1989). Anti-murine antibody response to mouse monoclonal antibodies: clinical findings and implications. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part B, Nuclear Medicine and Biology*, 16(2), 121–125. [https://doi.org/10.1016/0883-2897\(89\)90182-7](https://doi.org/10.1016/0883-2897(89)90182-7)
73. Rivera, A. M., May, S., Lei, M., Qualls, S., Bushey, K., Rubin, D. B., & Barra, M. E. (2020). CAR T-Cell-Associated Neurotoxicity: Current Management and Emerging Treatment Strategies. *Critical Care Nursing Quarterly*, 43(2), 191–204. <https://doi.org/10.1097/CNQ.0000000000000302>
74. Roberts, Z. J., Better, M., Bot, A., Roberts, M. R., & Ribas, A. (2018). Axicabtagene ciloleucel, a first-in-class CAR T cell therapy for aggressive NHL. *Leukemia & Lymphoma*, 59(8), 1785–1796. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1387905>
75. Roex, G., Timmers, M., Wouters, K., Campillo-Davo, D., Flumens, D., Schroyens, W., Chu, Y., Berneman, Z. N., Lion, E., Luo, F., & Anguille, S. (2020). Safety and clinical efficacy of BCMA CAR-T-cell therapy in multiple myeloma. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 164. <https://doi.org/10.1186/S13045-020-01001-1>
76. Sadelain, M., Brentjens, R., & Rivière, I. (2009). The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Current Opinion in Immunology*, 21(2), 215–223. <https://doi.org/10.1016/J.COI.2009.02.009>
77. Sadelain, M., Brentjens, R., & Rivière, I. (2013). The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discovery*, 3(4), 388–398. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0548/42970/P/THE-BASIC-PRINCIPLES-OF-CHIMERIC-ANTIGEN-RECEPTOR>

78. Santomasso, B. D., Park, J. H., Salloum, D., Riviere, I., Flynn, J., Mead, E., Halton, E., Wang, X., Senechal, B., Purdon, T., Cross, J. R., Liu, H., Vachha, B., Chen, X., Deangelis, L. M., Li, D., Bernal, Y., Gonen, M., Wendel, H. G., Brentjens, R. J. (2018). Clinical and biological correlates of neurotoxicity associated with car t-cell therapy in patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Discovery*, 8(8), 958–971. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-1319/333349/AM/CLINICAL-AND-BIOLOGIC-CORRELATES-OF-NEUROTOXICITY>
79. 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. *Annals of Oncology*, 32(1), 34–48. <https://doi.org/10.1016/J.ANNONC.2020.10.478>
80. Schuster, S. J., Bishop, M. R., Tam, C. S., Waller, E. K., Borchmann, P., McGuirk, J. P., Jäger, U., Jaglowski, S., Andreadis, C., Westin, J. R., Fleury, I., Bachanova, V., Foley, S. R., Ho, P. J., Mielke, S., Magenau, J. M., Holte, H., Pantano, S., Pacaud, L. B., ... Maziarz, R. T. (2019). Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, 380(1), 45–56. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1804980>
81. Shah, N. N., Highfill, S. L., Shalabi, H., Yates, B., Jin, J., Wolters, P. L., Ombrello, A., Steinberg, S. M., Martin, S., Delbrook, C., Hoffman, L., Little, L., Ponduri, A., Qin, H., Qureshi, H., Dulau-Florea, A., Salem, D., Wang, H. W., Yuan, C., ... 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. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 38(17), 1938–1950. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.03279>
82. Sheridan, C. (2015). Amgen's bispecific antibody puffs across finish line. *Nature Biotechnology*, 33(3), 219–221. <https://doi.org/10.1038/NBT0315-219>
83. Stadtmauer, E. A., Fraietta, J. A., Davis, M. M., Cohen, A. D., Weber, K. L., Lancaster, E., Mangan, P. A., Kulikovskaya, I., Gupta, M., Chen, F., Tian, L., Gonzalez, V. E., Xu, J., Jung, I. young, Joseph Melenhorst, J., Plesa, G., Shea, J., Matlawski, T., Cervini, A., ... June, C. H. (2020). CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*, 367(6481). https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABA7365/SUPPL_FILE/ABA7365_TABLE_S4.XLSX
84. *Státní ústav pro kontrolu léčiv*. (n.d.). Retrieved February 23, 2023, from <https://www.sukl.cz>
85. Štěpán Hrabovský. (2020). CAR T-lymfocyty: horká novinka v léčbě nádorů. *VNITŘNÍ LÉKAŘSTVÍ*, 66(7), 420–424. <https://www.casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2020/07/04.pdf>
86. Sterner, R. C., & Sterner, R. M. (2021). CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer Journal*, 11(4), 69. <https://doi.org/10.1038/S41408-021-00459-7>

87. Styczyński, J. (2020). A brief history of CAR-T cells: from laboratory to the bedside. *Acta Haematologica Polonica*, 51(1), 2–5. <https://doi.org/10.2478/AHP-2020-0002>
88. Subklewe, M., von Bergwelt-Baildon, M., & Humpe, A. (2019). Chimeric Antigen Receptor T Cells: A Race to Revolutionize Cancer Therapy. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 46(1), 15–24. <https://doi.org/10.1159/000496870>
89. Suhoski, M. M., Golovina, T. N., Aqui, N. A., Tai, V. C., Varela-Rohena, A., Milone, M. C., Carroll, R. G., Riley, J. L., & June, C. H. (2007). Engineering artificial antigen-presenting cells to express a diverse array of co-stimulatory molecules. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 15(5), 981–988. <https://doi.org/10.1038/MT.SJ.6300134>
90. Teoh, P. J., & Chng, W. J. (2021). CAR T-cell therapy in multiple myeloma: more room for improvement. *Blood Cancer Journal*, 11(4), 84. <https://doi.org/10.1038/S41408-021-00469-5>
91. Todorovic, Z., Todorovic, D., Markovic, V., Ladjevac, N., Zdravkovic, N., Djurdjevic, P., Arsenijevic, N., Milovanovic, M., Arsenijevic, A., & Milovanovic, J. (2022). CAR T Cell Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia: Successes and Shortcomings. *Current Oncology*, 29(5), 3647. <https://doi.org/10.3390/CURRONCOL29050293>
92. U.S. National Library of Medicine. (n.d.). *ClinicalTrials.gov*. U.S. National Library of Medicine. Retrieved February 13, 2023, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=CAR-T+cell&cntry=&state=&city=&dist=&recrs=d&type=Intr>
93. Wang, X., & Rivière, I. (2016). Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 3, 16015. <https://doi.org/10.1038/MTO.2016.15>
94. Wang, Y., Qi, K., Cheng, H., Cao, J., Shi, M., Qiao, J., Yan, Z., Jing, G., Pan, B., Sang, W., Li, D., Wang, X., Fu, C., Zhu, F., Zheng, J., Li, Z., & Xu, K. (2020). Coagulation Disorders after Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy: Analysis of 100 Patients with Relapsed and Refractory Hematologic Malignancies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 26(5), 865–875. <https://doi.org/10.1016/J.BBMT.2019.11.027>
95. Yakoub-Agha, I., Chabannon, C., Bader, P., Basak, G. W., Bonig, H., Ciceri, F., Corbacioglu, S., Duarte, R. F., Einsele, H., Hudecek, M., Kersten, M. J., Köhl, U., Kuball, J., Mielke, S., Mohty, M., Murray, J., Nagler, A., Robinson, S., Saccardi, R., ... Kröger, N. (2020). Management of adults and children undergoing chimeric antigen receptor T-cell therapy: best practice recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the Joint Accreditation Committee of ISCT and EBMT (JACIE). *Haematologica*, 105(2), 297. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2019.229781>

96. Ying, Z., He, T., Wang, X., Zheng, W., Lin, N., Tu, M., Xie, Y., Ping, L., Zhang, C., Liu, W., Deng, L., Qi, F., Ding, Y., Lu, X. an, Song, Y., & Zhu, J. (2019). Parallel Comparison of 4-1BB or CD28 Co-stimulated CD19-Targeted CAR-T Cells for B Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Molecular Therapy Oncolytics*, 15, 60–68. <https://doi.org/10.1016/J.OMTO.2019.08.002>
97. Zhao, Z., Condomines, M., van der Stegen, S. J. C., Perna, F., Kloss, C. C., Gunset, G., Plotkin, J., & Sadelain, M. (2015). Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. *Cancer Cell*, 28(4), 415–428. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2015.09.004>