

UNIVERZITA KARLOVA

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



**Geneticky modifikované T lymfocyty pomocí chimérických antigenních receptorů  
v léčbě hematologických malignit**

HABILITAČNÍ PRÁCE

MUDr. Pavel Otáhal, Ph.D.

Praha 2023

## **Předmluva**

Předkládaná habilitační práce je výsledkem mého vědeckého zájmu o problematiku nádorové imunoterapie pomocí geneticky modifikovaných T-lymfocytů, tzv. CAR-T cells. Problematice interakce imunitního systému s nádorovými buňkami se věnuji od zahájení mého PhD studia v roce 2000. V souvislosti s rozvojem nových technologií založených na geneticky upravených T lymfocytech pomocí chimerických T receptorů (CAR-T buňky) se můj zájem soustředil na toto nové téma, které je zajímavé nejen z pohledu základního výzkumu, ale má i zcela jasný aplikační potenciál. Práce obsahuje souhrn znalostí o léčbě pacientů s B-ALL/B-NHL pomocí komerčního CD19-specifického přípravku tisagenlecleucel. Dále práce obsahuje předběžné výsledky klinické studie pomocí originálního CAR-T přípravku vyvinutého v ÚHKT v léčbě dospělých pacientů s B-buněčnými malignitami. Součástí předložené práce je soubor pěti původních vědeckých prací, které jsou in extenso řazeny samostatně formou příloh. Tyto práce jsou opatřeny komentářem a jsou zasazeny do kontextu mých odborných aktivit.

Je mou milou povinností na tomto místě poděkovat především prof. MUDr. Petru Cetkovskému, Ph.D., MBA za dlouholetou podporu, kterou mi poskytl pro rozvoj vlastní výzkumné činnosti v ÚHKT a prof. MUDr. Marku Trněnému za podporu v získání odborné kvalifikace v hematologii. Dík patří všem kolegům z klinického úseku ÚHKT, kteří se podílejí na vývoji a léčbě pomocí CAR-T buněk, zejména MUDr. Petru Lesnému Ph.D., vedoucímu výrobní facility, kde probíhá výroba CAR-T buněk a primáři MUDr. Janu Vydrovi Ph.D., vedoucímu klinické studie s ÚHKT CAR-T.

V Praze 29.března 2023

## Obsah

Úvod .....	5
Princip fungování CAR-T .....	6
Struktura CAR .....	6
Doména rozpoznávající antigen .....	6
Linker .....	6
Transmembránová doména .....	6
Intracelulární T buněčná signalizační doména .....	6
Historie léčby pomocí CAR-T .....	7
Schválené CAR-T přípravky v současnosti .....	9
Léčba hematologických malignit pomocí CAR-T .....	11
Terapie B-NHL pomocí CAR-T .....	11
Terapie AML pomocí CAR-T .....	11
Nejvýznamnější antigeny používané pro cílenou eliminaci AML buněk .....	12
Lewis Y antigen .....	12
CD44v6 .....	12
CD33 .....	12
CD123 .....	12
<i>CLEC12A</i> .....	13
Terapie T-buněčných malignit pomocí CAR-T .....	13
Metody přípravy CAR-T .....	16
Next-generation CAR-T .....	18
Zvýšení bezpečnost CAR-T omezením rizika CRS a off-target cytotoxicity .....	19
Off-target cytotoxicita .....	20
Eliminace nádorové buňky pomocí kombinace několika antigenů současně .....	20
Cílená eliminace CARů in vivo .....	20
Zvýšení perzistence CAR-T in vivo .....	21
Rizika spojená s editováním genomu .....	21
Výsledky .....	24
Analýza pacientů léčených přípravkem UHKT CAR19 .....	24
Zhodnocení účinnosti a toxicity přípravku UHKT CAR19 .....	28
Imunomonitoring pacientů léčených přípravkem Kymriah .....	29

Vývoj experimentálních CAR-T přípravků.....	30
Závěr.....	31
Přílohy.....	32
Publikace 1 .....	32
Publikace 2 .....	32
Publikace 3 .....	32
Publikace 4 .....	32
Publikace 5 .....	32
Literatura .....	33

## Úvod

Relabující nebo rezistentní B-buněčné akutní lymfoblastické leukémie a B-buněčné Non-Hodgkinské lymfomy (r/r B-ALL/B-NHL), tvoří heterogenní skupinu obtížně léčitelných hematologických malignit. Standardní léčba je založena na kombinaci chemoterapie, terapie monoklonálními protilátkami či inhibitory signalizačních drah a autologní nebo alogenní transplantace krvetvorných buněk (Klebanoff et al., 2014). Pacienti, kteří mají opakovaně relabující onemocnění nebo onemocnění refrakterní na léčbu naléhavě potřebují nové způsoby terapie, bohužel průměrná doba přežití u těchto pacientů je v úrovni několika měsíců. Mezi nejnovější způsoby léčby r/r B-ALL/B-NHL, které byly nedávno zavedeny do klinické praxe jsou inovativní terapeutické strategie založené na geneticky upravených autologních T-lymfocytech pomocí tzv. Chimerických antigenních receptorů (CAR) (Suresh et al., 2014). Tento léčebný postup využívá metody genového inženýrství, kterými se do patientských T-lymfocytů vnese umělý gen – CAR, který umožní přesměrovat cytotoxickou aktivitu CAR-T lymfocytů na určitý vybraný povrchový antigen. V případě r/r B-ALL/B-NHL se ukázal jako nejvhodnější cíl povrchový protein CD19, který je přítomen na většině B-buněčných malignit, podobně efektivní, ale méně používaný cíl je povrchový protein CD20. Tyto tzv. CD19 CAR-T lymfocyty jsou v současné době dostupné již jako registrovaný přípravek a používají se pro léčbu pacientů s r/r B-ALL/B-NH. (Porter et al., 2011) Léčba pomocí CAR-T lymfocytů se klinicky testuje také u solidních nádorů nehematologického původu, bohužel ale účinnost je významně menší než v případě B-ALL/B-NHL. Pro tyto účely se vyvíjejí CAR-T specifické např. na antigeny GD2 u neuroblastomu, PSMA u ca prostaty, EGFR u epitelálních karcinomů, nebo IL13R u glioblastomů (Kakarla & Gottschalk, 2014; Suresh et al., 2014). (Lamers et al., 2013).

Předmětem této práce je popis prvních zkušeností v ČR s léčbou pomocí komerčních CD19 CAR-T lymfocytů u pacientů léčených v ÚHKT a VFN. V druhé části práce jsou shrnuty zkušenosti s vývojem nových originálních přípravků na bázi CAR-T lymfocytů a předběžné výsledky klinického testování CD19-specifický CAR-T, které v současnosti probíhá v ÚHKT (CART19 Cells Effects in Patients With Relapsed or Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphoma, NCT05054257). Autor se věnuje tématu CAR-T dlouhodobě a v uplynulých letech se podílel jako hlavní řešitel, nebo spoluřešitel řady grantů (NT14030, NV15-34498 A, NV19-08-00147, PRIMUS UK). Jednalo se o výzkumné projekty translačního charakteru s jasným aplikačním záměrem, které si kladly za cíl vyvíjet nové CAR-T na hematologické malignity. Výsledky těchto projektů byly prezentované ve formě publikací uvedených v této práci. Současně probíhal aplikační vývoj ve

spolupráci s kolegy v ÚHK T s cílem zavést certifikovanou výrobu CD19-specifických CAR-T lymfocytů a zahájit jejich klinické testování

## Princip fungování CAR-T

### Struktura CAR

Chimérické antigenní receptory slučují několik mechanismů fyziologické aktivace T buněk. Při vazbě antigenu na CAR dojde k aktivaci T buňky a zabití cílové buňky – v podstatě se takto kombinují vlastnosti protilátky, T-buněčného receptoru a kostimulačního receptoru do jediného proteinu. CAR se skládá ze čtyř základních segmentů: protilátkové domény rozpoznávající antigen, spojovací extracelulární oblasti (linker), transmembránové domény a intracelulární signalizační domény (Sadelain et al., 2013).

### Doména rozpoznávající antigen

Doména rozpoznávající antigen je typicky odvozena z monoklonální protilátky jako tzv. jednořetězcový variabilní fragment (scFv). scFv je chimérický protein tvořený lehkými (VL) a těžkými (VH) řetězci imunoglobulinů, spojený s krátkým linkerovým peptidem např. typu 3x gly-gly-gly-ser. Kromě protilátek lze podobně využít také přirozené ligandy některých povrchových receptorů jako jsou cytokiny, např. GM-CSF, nebo Flt3. Tyto typy CARů se označují jako ligand-based CAR (Sadelain et al., 2013). (Hughes-Parry et al., 2020; Wong et al., 2022)

### Linker

Tato doména ovlivňuje flexibilitu scFv receptoru a nepřímo ovlivňuje vazbu antigenu na CAR-T buňky. Struktura linkerů je obvykle odvozená od membránově-proximálních oblastí jiných povrchových receptorů jako jsou konstantní oblast IgG, CD8 nebo CD28.

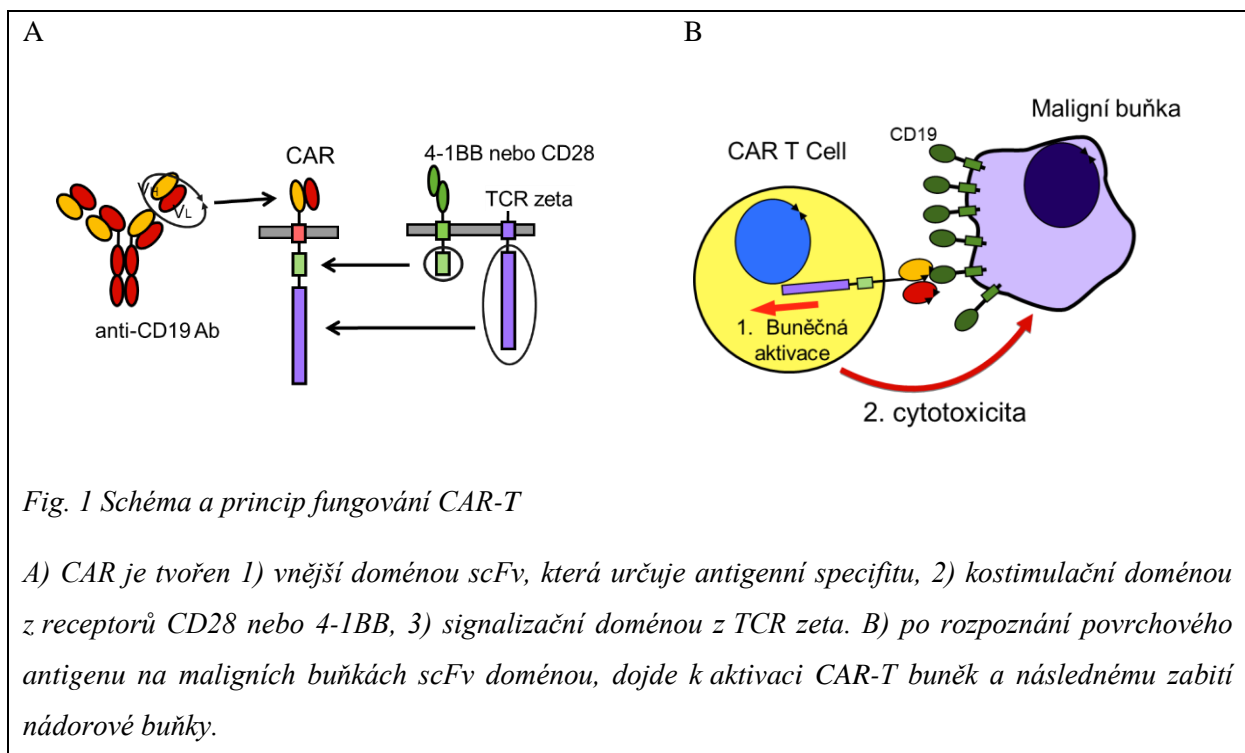
### Transmembránová doména

Transmembránová doména ukotvuje CAR k plazmatické membráně a je nezbytná pro stabilitu receptoru jako celku. Standardně se používá transmembránová doména z receptorů jako jsou CD8, CD8, CD28. Použití transmembránové domény CD3-zeta je nevhodné, protože to může vést k dimerizaci CARů s endogenním TCR (Sadelain et al., 2013).

### Intracelulární T buněčná signalizační doména

Intracelulární T buněčná signalizační doména je zodpovědná za aktivitu CARů. Poté, co je antigen navázan na scFv, vnitřní cytoplazmatický konec receptoru je rozpoznán kinázami Lck a ZAP70 a fosforylován analogicky jako endogenní TCR. Normální aktivace T lymfocytů závisí na fosforylaci aktivačních motivů na bázi imunoreceptoru tyrosinu (ITAM) přítomných v cytoplazmatické doméně CD3-zeta (Abram et al., 2014). Proto se cytoplazmatická doména CD3-zeta používá jako hlavní signalizační doména CARů. Byly také vyzkoušeny jiné domény obsahující ITAM, jako jsou např.

DAPI10, Fc $\gamma$ 2 ale ty nejsou tak účinné. Účinná aktivace T lymfocytů vyžaduje signalizaci přes kostimulační molekuly, z tohoto důvodu endodomény CARů obvykle také zahrnují jednu nebo více domén z kostimulačních proteinů. Byly úspěšně testovány signální domény z široké škály kostimulačních molekul, včetně CD28, CD27, CD134 (OX40) a CD137 (4-1BB) (Hughes-Parry et al., 2020). První generace CARů obsahovala pouze cytoplazmatickou doménu CD3-zeta. Druhá generace CAR přidává kostimulační doménu z CD28 nebo 4-1BB. Zapojení těchto intracelulárních signálních domén výrazně zlepšuje proliferaci T buněk, sekreci cytokinů, rezistenci na apoptózu a perzistenci in vivo. To je hlavní důvod proč CARy 1. generace nebyly účinné v prvních klinických studiích. Třetí generace CAR kombinuje více kostimulačních domén, jako je CD28-41BB nebo CD28-OX40, pro zvýšení aktivity T buněk. Předklinické údaje ukazují, že CAR třetí generace vykazují lepší efektorové funkce a lepší perzistenci in vivo ve srovnání s CAR druhé generace, nicméně tyto efekty nebyly prokázány v klinických studiích (Tang et al., 2016) .



## Historie léčby pomocí CAR-T

První chimérické receptory složené z extracelulární antigen-specifické domény a intracelulární signální domény obsahující část T-buněčného receptoru (TCR) byly popsány v roce 1987 Yoshihisou Kuwanou v Japonsku (Kuwana et al., 1987) a nezávisle v roce 1989 Zeligem Eshharem v Izraeli. (Gross et al., 1989). V roce 1991 bylo Arthurem Weissem z Kalifornské univerzity v San

Franciscu ukázáno, že chimérické receptory složené z extracelulární části proteinu CD25 (receptor pro IL-2) a intracelulární signalizační domény z CD3 $\zeta$  mohou aktivovat signalizaci T lymfocytů. Tento CD25-TCRzeta chimérický receptor byl použit ke studiu základních mechanismů T-buněčné signalizace a výsledky těchto experimentů umožnily porozumět základním biochemickým dějům spojeným s aktivací src kináz jako je Lck a ZAP-70 (Irving & Weiss, 1991). Již v této době bylo popsáno možné terapeutické využití, bohužel však tehdejší generace CAR receptorů postrádala účinnost. První klinická studie s CAR- T buňkami tzv. 1. generace byla realizována biotechnologickou společností Cell Genesis v roce 1990 pro léčbu infekce virem HIV. Jednalo se o adoptivně přenesené autologní T buňky modifikované pomocí CAR složeného z extracelulární domény CD4 a intracelulární domény CD3zeta. Tyto tzv. CD4zeta (CD4 $\zeta$ ) se aktivují po vazbě na HIV gp120 protein na povrchu infikovaných buněk (Romeo & Seed, 1991). Podobné klinické studie CAR T buněk byly provedeny u pacientů se solidními nádory pomocí CAR rozpoznávající nádorové antigeny, jako je. Tyto studie však neprokázaly dlouhodobou perzistenci aplikovaných T lymfocytů a léčebný efekt nebyl prokázán (Wilkie et al., 2008). Nezávisle na klinických studiích však dále probíhal základní výzkum CAR technologie a byly vyvinuty účinnější typy receptorů. V roce 2000 bylo zjištěno, že přidání kostimulační domény z receptorů CD28 nebo 41BB k intracelulární doméně CD3 $\zeta$  výrazně zvýší perzistenci CAR-T buněk v in vivo v myších modelech a tyto nové konstrukce se proto označují CAR druhé generace (Strome et al., 2000). První studie CAR T buněk, zahájené v r. 2001, zahrnovaly pacientky s pokročilým epiteliálním karcinomem vaječníků nebo metastazujícím renálním karcinomem a zaměřily se na folátový receptor a karbon-anhydráza IX (CAIX) (Lamers et al., 2013). V roce 2008 byla provedena studie s anti-CD20 CARy u pacientů s B-NHL, která ukázala efektivitu této terapie (Till et al., 2008, 2012). Přelomové výsledky byly popsány v roce 2010 kdy byly na University of Pennsylvania, v Memorial Sloan Kettering Cancer Center a NCI NIH provedeny první klinické studie s CARy druhé generace rozpoznávající CD19 protein který je exprimován B-buněčnými leukémiemi a lymfomy (Kochenderfer et al., 2010; Porter et al., 2011). Tyto studie prokázaly klinickou účinnost terapie CD19-specifickými CAR-T buňkami a navodily kompletní remise u mnoha těžce předlčených pacientů s refrakterními B-NHL a B-ALL. Tyto studie vedly v roce 2017 k prvnímu schválení přípravků na bázi CAR T buněk: tisagenlecleucel (Kymriah), uváděný na trh společností Novartis pro léčbu B-ALL a axicabtagen ciloleucel (Yescarta), uváděné na trh společností Kite Pharma pro léčbu difuzního velkobuněčného lymfomu (DLBCL). Tyto dva přípravky se liší typem intracelulární signalizační domény: tisagenlecleucel (označovaný jako tisa-cel) obsahuje 4-1BB-zeta intracelulární doménu a axicabtagen ciloleucel (označovaný jako axi-cel) obsahuje CD28-zeta intracelulární doménu. Výsledky klinických studií ukázaly překvapivé rozdíly ve funkci těchto dvou typů CAR-T buněk. Zjistilo se že CD28 signalizační doména vede k intenzivnější aktivaci CAR-T buněk s vyšším rizikem syndromu z cytokinové bouře (CRS) zatímco 4-1BB signalizační doména navodí mírnější aktivaci CAR-T buněk a nižší riziko CRS s pravděpodobně menším protinádorovým efektem, ale umožní delší přežívání CAR-



T buněk in vivo (Brentjens et al., 2013). Přesné porovnání účinnosti obou přípravků je stále aktivní téma v hematologii a nejspíše není mezi těmito přípravky zásadní rozdíl v klinickém efektu.

## Schválené CAR-T přípravky v současnosti

V současnosti jsou všechny schválené přípravky pouze pro léčbu hematologických malignit. Klinicky se ale testuje mnoho dalších typů CAR-T zejména na solidní nádory – tyto přípravky však postrádají podobnou účinnost jako CD19-specifické CAR-T a jejich vývoj je stále ve fázi klinického vývoje. Léčba komerčními přípravky CAR-T byla v ČR zahájena v r. 2020. První typ CAR-T aplikovaný v ČR byl přípravek Kymriah, což jsou CD19-specifické CAR-T. Zpočátku byla indikační kritéria pro přípravek Kymriah omezena na B-ALL pod 25 let věku a DLBCL, postupně se však tato indikační kritéria rozšiřují a současně přibývají další schválené přípravky (Tab. 2) i na další antigeny jako je BCMA u mnohočetného myelomu.

**Tab. 1 CAR-T přípravky schválené FDA**

Generický název	Komerční název	Výrobce	Datum schválení FDA	Antigen	Intracelulární signalizační doména
tisagenlecleucel	Kymriah	Novartis	8/2017	CD19	41BB - CD3 $\zeta$
axicabtagene ciloleucel	Yescarta	Kite Pharma / Gilead	10/2017	CD19	CD28 - CD3 $\zeta$
brexucabtagene autoleucel	Tecartus	Kite Pharma / Gilead	7/2020	CD19	CD28 - CD3 $\zeta$
lisocabtagene maraleucel	Breyanzi	Juno Therapeutics / BMS	2/2021	CD19	41BB - CD3 $\zeta$
idecabtagene vicleucel	Abecma	Bluebird Bio / BMS	3/2021	BCMA	41BB - CD3 $\zeta$
ciltacabtagene autoleucel	Carvykti	Janssen / J&J	2/2022	BCMA	41BB - CD3 $\zeta$

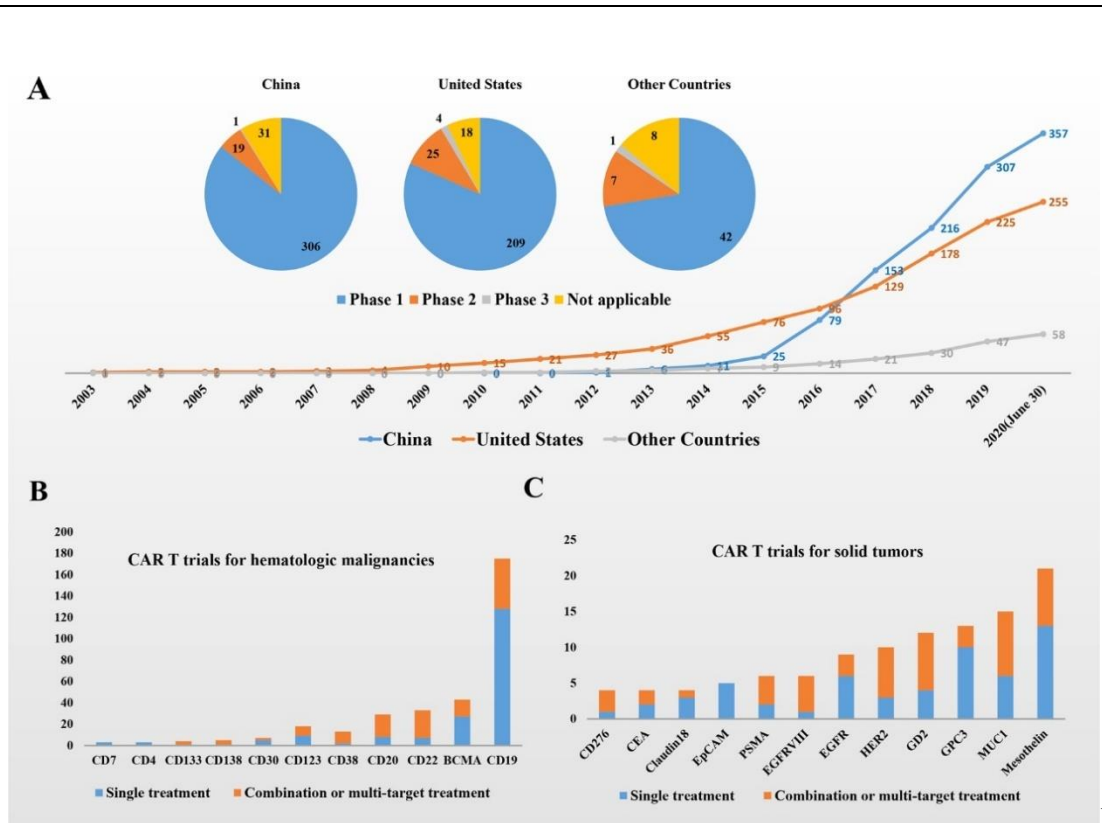


Fig. 2

Fig. 2 Vývoj nových přípravků CAR-T ve světě

A) srovnání počtu klinických studií s CAR-T v USA, Číně a zbytku světa od počátků vývoje této technologie. B) Nejčastěji testované antigeny u hematologických malignit. C) Nejčastěji testované antigeny u solidních nádorů. (Clinical development of CAR T cell therapy in China: 2020 update. Jianshu Wei et al, Cell Mol Immunol. 2021 Apr;18(4):792-804.)

## Léčba hematologických malignit pomocí CAR-T

### Terapie B-NHL pomocí CAR-T

B-buněčný non-Hodgkinův lymfom (B-NHL) je skupina klinicky heterogenních onemocnění zahrnujících difuzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL), lymfom z pláštěvých buněk (MCL), folikulární lymfom (FL) a další. DLBCL je nejběžnějším druhem B-NHL, tvoří asi 30–35 % ve všech B-NHL. Standardní terapií první volby je cyklofosamid, doxorubicin, vinkristin, prednison a rituximab (R-CHOP). Terapie druhé linie se skládají z vysokodávkované chemoterapie a autologní transplantace hematopoetických kmenových buněk (ASCT). Výsledky léčby pacientů refrakterních na chemoterapii jsou však extrémně nepříznivé a pro tyto pacienty jsou k dispozici CAR-T přípravky. Pro jednotlivé přípravky platí trochu odlišná indikační kritéria, ale v podstatě platí, že komerční přípravky (např. tisa-cel a axi-cel) lze použít pro léčbu pacientů s DLBCL, FL, MCL, a B-ALL po 2 a více liniích léčby. Řada studií (Juliet, ZUMA-1) prokázala účinnost CAR-T léčby u pacientů s r/r B-ALL a B-NHL (Westin et al., 2021). Účinnost jednotlivých přípravků se pravděpodobně trochu liší, real-world data ukázala, že axi-cel, který obsahuje CD28 kostimulační doménu, je o trochu více účinný než tisa-cel u pacientů s DLBCL (Ghafouri et al., 2021). Současně ale axi-cel má trochu vyšší toxicitu než tisa-cel v důsledku vyvolání vyšších prozánětlivých efektů způsobenou vyšší sekrecí cytokinů IL-1, IL-6, IL-15. Právě tento zvýšený pro-zánětlivý účinek může posílit protinádorovou imunitní reakci za cenu vyšší toxicity.

### Terapie AML pomocí CAR-T

Terapie AML pomocí CAR-T je mnohem obtížnější než terapie B-ALL/B-NHL kvůli nedostatku podobně účinného cíle jako je CD19. Zatím všechny klinicky testované antigeny jako jsou například CD33, CD123, CLEC12A, jsou také exprimovány zdravými hematopoetickými progenitorovými buňkami a terapie cílící na tyto antigeny proto také může poškodit normální hematopoezu (Tettamanti et al., 2014). K překonání této off-target cytotoxicity byly vyvinuty různé přístupy. Např. lze použít CAR-T buňky co-exprimující antigeny CD20 a EGFR což umožňují jejich selektivní eliminaci in vivo pomocí terapeutických protilátek rituximab nebo cetuximab (Zhang et al., 2017). V případě rozvoje závažné cytopenie je možné pacienty indikovat k transplantaci hematopoezy, tj. musí mít vybraného dárce před zahájením terapie. Terapie CAR-T může být použita jako překlenovací terapie před alogenní transplantací hematopoetických kmenových buněk (aloSCT) již v době indikace pro léčbu pomocí CAR-T což také zajistí eliminaci podávaných CAR-T.

## Nejvýznamnější antigeny používané pro cílenou eliminaci AML buněk

### Lewis Y antigen

Lewis Y antigen také označovaný jako LeY je oligosacharid exprimovaný na řadě epiteliálních karcinomů a na maligních buňkách krvetvorby včetně AML, ale není exprimován na zdravé hematopoeze. LeY byl jeden z prvních cílů pro terapií AML pomocí CAR-T (NCT01716364). V této studii na 4 pacientech se ukázala bezpečnost a účinnost LeY CAR-T. 2 pacienti dosáhli remise onemocnění a nedošlo k rozvoji závažné toxicity a LeY CAR-T dlouhodobě přežívali v organismu těchto pacientů (P. et al., 2013).

### CD44v6

Hyaluronový receptor CD44v6 je další možný target terapie AML pomocí CAR-T. Tento antigen je exprimovaný buňkami AML a současně není přítomen na zdravé hematopoeze. Bohužel klinické testování CD44v6 CAR-T nebylo úspěšné a pacienti měli závažné projevy toxicity – těžké monocytopenie a studie byly ukončené (Awuah et al., 2021).

### CD33

CD33 je transmembránový receptor z rodiny SIGLEC a je přítomný na cca 90% případů AML. Současně je ale také přítomný na zdravé hematopoeze což zásadně limituje jeho použití jako terapeutického cíle - v klinických studiích s CD33 CAR-T se ukázaly jejich významné toxické účinky (Biedermann et al., 2007).

### CD123

CD123 je transmembránový receptor pro interleukin 3 a je exprimován velkou většinou AML blastů, současně je přítomen v nízkém množství na zdravé hematopoeze. V současnosti probíhá několik klinických studií s CD123 CAR-T (NCT04318678, NCT02159495, NCT03190278) a předběžné výsledky naznačují, že by tato terapie mohla být pro pacienty prospěšná. Nebyly popsány závažné cytopenie ani jiné závažné nežádoucí účinky. Nicméně pro riziko myeloablace musí mít CD123 CAR-T bezpečnostní pojistku jako je např. CD20 nebo EGFR a používají se v kombinaci s transplantací krvetvorby (Mardiros et al., 2013).

## CLEC12A

Tento target se také označuje jako CLL1 a je široce exprimován jak AML blasty, tak na zdravých myeloidních buňkách včetně neutrofilů. Použití CLL1 CAR-T je proto limitované jako konsolidační léčba k eliminaci reziduálních AML buněk po předchozí chemoterapii (Willier et al., 2021).

## Terapie T-buněčných malignit pomocí CAR-T

Základním problémem terapie malignit T lymfocytů pomocí CAR-T je nedostatek efektivního cílového antigenu, jako je antigen CD19. Většina antigenů experimentálně cílených CAR-T buňkami je také přítomna na zdravých T-lymfocytech, vhodnými antigeny se zdají CD4, CD5, CD7, CD30 a TCR-alfa/beta řetězec (Haydu & Abramson, 2021; Scarfò et al., 2019; Wu et al., 2022). Cílení těchto antigenů však může vést k vzájemnému zabíjení CAR-T (tzv. bratrovražda) a významně tak omezi účinnost jejich výroby. Tento problém lze vyřešit cíleným odstraněním tohoto antigenu na CAR-T buňkách pomocí DNA nukleáz CRISPS-Cas9 nebo TALEN (Georgiadis et al., 2021). Současně lze provést eliminaci endogenního T-buněčného receptoru což umožní použití alogenních CAR-T buněk od zdravých nepříbuzných dárců. Například delece CD7 a alfa řetězce receptoru T buněk (TRAC) pomocí CRISPR/Cas9 a současně transdukce lentivirem obsahující CAR specifický pro CD7 umožnila účinné cílení a usmrcení maligních T buněk bez významné bratrovraždy CAR-T buněk. Delece TRAC blokovala signalizaci zprostředkovanou TCR, čímž omezila život ohrožující GvHD a umožnila bezpečné použití alogenních T buněk jako zdroje CAR-T buněk (Cooper et al., 2018). Výroba CAR-T lymfocytů je dále komplikována častou přítomností maligních T lymfocytů v periferní krvi, což může vést k transdukci těchto maligních T lymfocytů virovým vektorem během výroby a kontaminaci vyprodukovaných CAR-T buněk. Výroba tzv. alogenních CAR-T od zdravých dárců účinně eliminuje riziko kontaminace maligními T buňkami během výroby, avšak vyžaduje složitý knock-out endogenního TCR pomocí DNA nukleáz(Wu et al., 2022). Zajímavé je, že antigen CD5 indukuje omezenou bratrovraždu navzdory své expresi CAR-T buňkami, protože povrchová exprese CD5 se rychle snižuje v důsledku internalizace při vazbě na specifickou protilátku (Mamonkin et al., 2015) . CD5 však není univerzálním cílem, protože není exprimován v dostatečném množství na maligních T-buňkách. Dalším zajímavým cílem s omezenou bratrovraždou je beta řetězec receptorů T-buněk který je tvořen jednou z konstantních domén TRBC1 nebo TRBC2 a umožňuje efektivní cílení podmnožiny malignit T-buněk, protože normální populace T buňek se skládá z podskupin TRBC1 i TRBC2, zatímco malignity jsou klonální a pozitivní pouze pro jednu konstantní doménu beta řetězce receptoru T-buněk. Podobný antigen, který je exprimován pouze podskupinou T buněk, je CD4. Zatímco cílení na CD4 částečně zabraňuje bratrovraždě během výroby, eradikace normálních CD4+ T buněk by vedla k aplazii T-buněk a následně k syndromu podobnému HIV/AIDS (Ma et al.,

2019). Přesto však jsou CD4-specifické CAR-T buňky v současné době zkoumány v klinických studiích, jako je NCT04712864.

Několik studií popsalo účinnou prevenci bratrovraždy cílenou eliminací targetu pomocí DNA nukleáz. Například Gomes-Silva et al použili CRISPR-Cas9 k eliminaci antigenu CD7 v T buňkách používaných pro výrobu CD7-specifických CAR-T buněk (Gomes-Silva et al., 2017). Jejich předklinická studie ukázala, že vypnutí genu CD7 učinilo CD7 CAR T buňky rezistentní vůči bratrovraždě, což umožnilo robustní expanzi. Podobně Cooper et al. vygenerovali pomocí CRISPR-Cas9 CD7-specifické CAR-T buňky s narušenou expresí CD7 a TCR alfa řetězce a vytvořili univerzální CD7 CAR T buňky UCART7 (Ghobadi et al., 2021). Tyto buňky UCART7 účinně zabíjely lidské T-ALL buněčné linie a primární T-ALL odvozené od pacienta in vitro a in vivo, aniž by vedly ke xenogenní GvHD. Dalším kritickým problémem je eliminace všech zdravých T buněk podávanými CAR-T buňkami což je podstatně větší problém, než je aplazie B-buněk vyvolána CD19 CAR-T. Tento nežádoucí účinek lze odstranit podobně jako u AML CARů pomocí cílené eliminace podaných CAR-T v kombinaci s transplantací hematopoézy.

**Tab. 2**

**Významné klinické studie s CAR-T na AML dle databáze Clinical Trials Gov k 10/2022**

NCT číslo	Antigen	Jméno studie	Místo
NCT05105152	CD33	PLAT-08: A Study Of SC-DARIC33 CAR T Cells In Pediatric And Young Adults With Relapsed Or Refractory CD33+ AML	Seattle Children's Hospital, United States
NCT03971799	CD33	Study of Anti-CD33 Chimeric Antigen Receptor-Expressing T Cells (CD33CART) in Children and Young Adults With Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia	Children's Hospital of Los Angeles, States Children's Hospital of Colorado, National Cancer Institute - NIH, Dana-Farber Cancer Institute, The Children's Hospital of Philadelphia, Fred Hutchinson Cancer Research Center, United States
NCT03927261	CD33	PRGN-3006 Adoptive Cellular Therapy for Relapsed or Refractory AML or Higher Risk MDS	H Lee Moffitt Cancer Center, Mayo Clinic, United States
NCT04678336	CD123	CD123 Redirected T Cells for AML in Pediatric Subjects	Children's Hospital of Philadelphia, United States
NCT04318678	CD123	CD123-Directed Autologous T-Cell Therapy for Acute Myelogenous Leukemia (CATCHAML)	St Jude Children's Research Hospital, United States
NCT04230265	CD123	Dose-escalating Trial With UniCAR02-T Cells and CD123 Target Module (TM123) in Patients With Hematologic and Lymphatic Malignancies	Germany

NCT03190278	CD123	Study Evaluating Safety and Efficacy of UCART123 in Patients With Relapsed/ Refractory Acute Myeloid Leukemia	University of California, H. Lee Moffitt Cancer Center, Dana-Farber Cancer Institute, Roswell Park Cancer Institute, Weill Medical College of Cornell University, University of Pennsylvania - Abramson Cancer Center, MD Anderson Cancer Center, United States
NCT04219163	CLL-1	Chimeric Antigen Receptor T-cells for The Treatment of AML Expressing CLL-1 Antigen	Texas Children's Hospital, United States
NCT04789408	CLL-1	Study Evaluating the Safety of KITE-222 in Participants With Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia	Stanford Cancer Center, Moffitt Cancer Center, Cleveland Clinic, Wexner Medical Center/James Cancer Hospital, MD Anderson Cancer Center, Fred Hutchinson Cancer Center, United States
NCT03904069	FLT3	Study Evaluating the Safety, Tolerability, and Efficacy of FLT3 CAR-T AMG 553 in FLT3-positive Relapsed/Refractory AML	City of Hope National Medical Center, Stanford University, MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, United States
NCT01716364	LewisY	Safety Study of Anti LewisY Chimeric Antigen Receptor in Myeloma, Acute Myeloid Leukemia or Myelodysplastic Syndrome	Peter MacCallum Cancer Centre, Australia

**Tab. 3**

**Významné klinické studie s CAR-T na AML a T-NHL dle databáze Clinical Trials Gov k 10/2022**

NCT číslo	Antigen	Jméno studie	Místo
NCT05138458	CD5	A Study of MT-101 in Subjects With CD5+ Relapsed/Refractory TCL	City of Hope Comprehensive Cancer Center, Colorado Blood Cancer Institute, Miami Cancer Institute at Baptist Health, Dana-Farber/Mass General Brigham Cancer Care, Tennessee Oncology / Sarah Cannon Research Institute, University of Virginia Comprehensive Cancer Center, United States
NCT03081910	CD5	Autologous T-Cells Expressing a Second Generation CAR for Treatment of T-Cell Malignancies Expressing CD5 Antigen	Texas Children's Hospital, United States
NCT04984356	CD7	A Phase 1/2 Study of the Safety and Efficacy of Anti-CD7 Allogeneic CAR-T Cells (WU-CART-007) in Patients With Relapsed or Refractory T-ALL/LBL	City of Hope, Duarte, California, Moffitt Cancer Center, Children's Hospital of Philadelphia, Vanderbilt University, University of Wisconsin, United States, Peter MacCallum Cancer Centre, Australia

NCT03690011	CD7	Cell Therapy for High Risk T-Cell Malignancies Using CD7-Specific CAR Expressed On Autologous T Cells	Texas Children's Hospital, United States
NCT04653649	CD30	CAR T-cells Against CD30 (HSP-CAR30) for Relapsed/ Refractory Hodgkin and T-cell Lymphoma.	Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain
NCT04288726	CD30	Allogeneic CD30.CAR-EBVSTs in Patients With Relapsed or Refractory CD30-Positive Lymphomas	Texas Children's Hospital, United States
NCT04083495	CD30	CD30 CAR for Relapsed/Refractory CD30+ T Cell Lymphoma	Lineberger Comprehensive Cancer Center at University of North Carolina, United States
NCT03602157	CD30	Study of CAR-T Cells Expressing CD30 and CCR4 for r/r CD30+ HL and CTCL	Lineberger Comprehensive Cancer Center at University of North Carolina, United States
NCT04502446	CD70	A Safety and Efficacy Study Evaluating CTX130 in Subjects With Relapsed or Refractory T or B Cell Malignancies (COBALT-LYM)	Stanford, New Haven, Connecticut, Miami, Florida, Houston, United States Sydney, Australia, Toronto, Canada
NCT03590574	TRBC1	Phase I/II Study Evaluating AUTO4 in Patients With TRBC1 Positive T Cell Lymphoma	Vall d'Hebron Institute of Oncology, Barcelona, Spain, Queen Elizabeth University Hospital, Glasgow, United Kingdom, University College London, Manchester Royal Infirmary Hospital, Manchester, United Kingdom, Freeman Hospital, The Newcastle upon Tyne Hospitals NHS Foundation Trust, United Kingdom

## Metody přípravy CAR-T

CAR-T léčivé přípravky patří do kategorie GMO ATMPs (genetically modified advanced therapeutical products) případně se označují jako léčivé přípravky (LP) pro buněčnou terapii. Základním principem těchto LP, je že se aplikují živé buňky, které byly geneticky upraveny. Metoda genové manipulace, použitá pro výrobu LP představuje „core“ celého přípravku a závisí na požadovaných vlastnostech LP. V současné době jsou k dispozici postupy, které umožňují vnášet nové geny do genomu (tj. transgeny). Dále existují zavedené postupy pro cílené editování genů pomocí systémů TALEN, či Crispr Cas/9, které umožňují cílené změny sekvence DNA – např. oprava vrozených mutací, vypnutí určitých genů, nebo vnášení nové sekvence do specifického DNA lokusu v genomu. Pro tyto účely se využívají jednak virové vektory jako jsou lentiviry a retroviry, nebo se používají neviróvé systémy, založené na fyzikálně-chemických postupech (Bishop et al., 2020; Yusa et al., 2011). Tyto neviróvé postupy jsou obvykle založeny na vnesení čisté DNA ve formě plazmidu do buňky pomocí krátkého výboje el. proudu – tzv. elektroporace, kdy jsou buňky vystaveny intenzitě el. pole cca 600V/cm po dobu 20 ms. Tento výboj vytvoří v membráně buněk otvory o velikosti v řádu nanometrů, kterými se do cytoplazmy buněk dostane plazmidová DNA nacházející se v elektroporačním roztoku, v kterém probíhá elektroporace.



Vytvořené mikropóry se rychle spontánně uzavřou po ukončení výboje a vnesená DNA se pak náhodným způsobem integruje do genomu. Pravděpodobnost integrace lze zásadně zvýšit použitím transpozonů, označované také jako tzv. „skákající geny“ (jumping genes) (Huang et al., 2009; Ptáčková et al., 2018). Transpozon je sekvence DNA, která obsahuje gen kódující tzv. transpozázu, což je enzym, který rozpozná sekvenci transpozonu a vloží ji do genomu (nebo ji z genomu také vyštípne). Pro účely genových modifikací se transpozony upravují tak, že transpozáza se vnáší na druhém plazmidu oddělená od transpozonu, který obsahuje gen kódující CAR (Obr. 1). Jiným nevirovým systéme je editace genomu pomocí systému CRISPR nebo TALEN, kdy se elektroporací vnáší enzym s DNázovou aktivitou a nová sekvence DNA, kterou se nahradí část genomu (Stadtmauer et al., 2020). Virové systémy využívají nejčastěji lentiviry (LV) což jsou modifikované viry HIV, kterým byly vyměněna část genomu za novou sekvenci kódující CAR. Podobným způsobem se používají i modifikované retroviry (RV) odvozené např. od viru MMLV (Ausubel et al., 2012; Rodrigues et al., 2011).

Každý z těchto systémů má své specifické výhody a nevýhody a jejich aplikace závisí na požadovaném cíli editace DNA. Virové systémy nevyžadují speciální přístroje jako je tzv. elektroporátor (zdroj el. pulzu) což je hlavní nevýhoda systémů založených na elektroporaci. Současně ale příprava certifikovaných LV a RV nezbytná pro výrobu přípravků je extrémně finančně a časově náročná, což limituje jejich použití zejména v akademických klinických studiích. Další nevýhoda LV/RV je jejich omezená kapacita pro velikosti vložené DNA, která umožňuje vnášet geny max 3-4kb dlouhé (resp. celá virová DNA je max. 7-8kb od 5'LTR-3'LTR). Transpozony oproti tomu mají kapacitu v řádu desítek kb DNA a jsou vhodné pro složitější způsoby genových úprav vyžadujících vnesení několika genů současně (Field et al., 2013; Rodrigues et al., 2011).

Postup vlastní výroby CAR-T na zobrazen na obr. 2. Nejprve se provádí odběr lymfocytů pomocí aferézy, nebo odběrem plné krve. Odebrané buňky se následně v inkubátoru aktivují v přítomnosti cytokinů a pak se provede vnesení transgenu kódující CAR. Modifikované buňky se dále kultivují in vitro a po dosažení dostatečné expanze se zamrazí a uskladní v tekutém dusíku. Vyrobený přípravek se pak analyzuje předepsanými kontrolními testy, které doloží jeho biologickou aktivitu a potvrdí úspěšnost výroby. Pokud jsou splněny předepsaná kritéria, lze následně přípravek aplikovat pacientům. V případě komerčních přípravků se odebrané buňky posílají do zahraničí do výrobní facility výrobce a připravené buňky se následně vrací zpět jako kryokonzerovaný produkt. Celý proces trvá v závislosti na volné výrobní kapacitě dodavatele cca 1-2 měsíce a představuje náklady cca 6 mil Kč na jeden produkt.

## Next-generation CAR-T

Technologie léčby pomocí CAR-T je jedno z nejdynamičtější se rozvíjejících oblastí biomedicínského výzkumu. Současné zkušenosti s CD19-specifickými CAR-T přípravky jsou jak pozitivní, tak ale i negativní. Léčba těmito přípravky nejlépe funguje u B-ALL, zatímco u agresivních lymfomů typu DLBCL je podstatně nižší. Pravděpodobně dobře účinná bude léčba BCMA-specifickými CAR-T u mnohočetného myelomu, bohužel ale solidní nádory jsou výrazně rezistentnější na léčbu CAR-T než hematologické malignity (Gregory et al., 2018). Důvody těchto rozdílů jsou intenzívně studovány a existuje řada nových experimentálních směrů zaměřených na vývoj další generace vylepšených tzv. next-generation CAR-T. V posledních cca 10-ti letech bylo popsáno mnoho nových experimentálních postupů umožňujících vybavit T lymfocyty řadou nových funkcí. Tyto postupy odpovídají na několik zásadních otázek: 1) jak zvýšit bezpečnost CARů omezením rizika CRS a off-target cytotoxicity, 2) jak lépe cílit nádorové buňky pomocí kombinace několika antigenů současně, 3) jak umožnit cílenou eliminaci CARů in vivo, 4) jak zvýšit jejich perzistenci in vivo, 5) jak eliminovat supresorické působení nádorového mikroprostředí, 6) jak navodit silnější protinádorové účinky.

Dále probíhá vývoj nových výrobních postupů umožňujících rychlejší a levnější přípravu CAR-T a vývoj nových metod genového inženýrství kterými lze do lymfocytů vnášet větší DNA konstrukty a současně cíleně provádět knock-out supresoricky působících genů v CAR-T pomocí technologií využívajících CRISPR/Cas9 nebo TALEN.

### Tab. 4

#### Významné klinické studie s enhancovanými CAR-T na B-ALL/B-NHL dle databáze Clinical Trials Gov k 10/2022

NCT číslo	Jméno studie	Genetická modifikace	Indikace	Místo
NCT05620342	Phase I Study Autologous CAR T-Cells Targeting the GD2 Antigen for Lung Cancer	GD2 CAR IL-15 caspase 9	karcinom plic	Lineberger Comprehensive Cancer Center, United States
NCT03721068	Study of CAR T-Cells Targeting the GD2 With IL-15+iCaspase9 for Relapsed/Refractory Neuroblastoma or Relapsed/Refractory Osteosarcoma	GD2 CAR IL-15 caspase 9	neuroblastom osteosarkom	Emory - Winship Cancer Institute, Lineberger Comprehensive Cancer Center at University of North Carolina, United States

NCT04715191	Interleukin-15 and -21 Armored Glypican-3-specific Chimeric Antigen Receptor Expressed in T Cells for Pediatric Solid Tumors	Glypican-3 CAR IL-15 IL-21	pediatrické solidní nádory	Texas Children's Hospital Houston, Texas, United States
NCT02498912	Cyclophosphamide Followed by Intravenous and Intraperitoneal Infusion of Autologous T Cells Genetically Engineered to Secrete IL-12 and to Target the MUC16ecto Antigen in Patients With Recurrent MUC16ecto+ Solid Tumors	MUC16 CAR IL-12	solidní nádory	Memorial Sloan Kettering Cancer Center, United States
NCT03635632	C7R-GD2.CART Cells for Patients With Relapsed or Refractory Neuroblastoma and Other GD2 Positive Cancers (GAIL-N)	GD2 CAR constitutively active IL-7 receptor	neuroblastom osteosarkom	Houston Methodist Hospital, United States
NCT04227275	A Study of CART-PSMA-TGFβRDN in Patients With Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer	PSMA CAR dominant-negative TGFβ receptor	karcinom prostaty	Moffitt Cancer Center, The University of Kansas Hospital, United States
NCT04684563	huCART19-IL18 in NHL/CLL Patients	CD19 CAR IL-18	CD19+ CLL/NHL	University of Pennsylvania, United States

### Zvýšení bezpečnost CAR-T omezením rizika CRS a off-target cytotoxicity

Jako každá jiná léčba, tak i použití CAR-T může být spojené s rozvojem závažných nežádoucích účinků. Tyto účinky jsou způsobené silnou aktivací a proliferací CAR-T během protinádorové reakce a jsou vyvolané uvolnění velkého množství prozánětlivých cytokinů stejnými fyziologickými mechanismy ke kterým dochází během přirozené imunitní reakce. Jedná se hlavně o cytokiny IL-6, IL-15, TNFα, které jsou produkovány aktivovanými T lymfocyty, a tedy také CAR-T vyvolají v organismu systémovou zánětlivou odpověď, tzv. CRS – cytokine release syndrome, syndrom z uvolnění cytokinů (Pulè et al., 2005) . Jedná se o nejzávažnější NÚ, který se v mírné podobě projevuje jako febrilie a v závažnější formě může vést až k oběhovému selhání a úmrtí. Tento NÚ lze částečně tlumit pomocí kortikoidů a anti-IL-6 protilátek (tocilizumab), nicméně i v současnosti může vést až k nutnosti oběhové podpory s UPV. Ukázalo se, že CAR-T obsahující CD28 kostimulační doménu způsobují závažnější CRS v důsledku intenzivnější aktivace CAR-T. Bylo popsáno i několik úmrtí během klinických studií s CD19-CD28-zeta CAR-T (Juno therapeutics). CAR-T obsahující 4-1BB doménu takto závažné NÚ nemají. Na druhou stranu ale je nutné poznamenat, že tyto důsledky byly výjimečné a jsou důsledkem účinného protinádorového efektu CAR-T (Porter et al., 2018).

### Off-target cytotoxicita

Tento NÚ je také v důsledku protinádorového působení CAR-T nicméně je způsoben koexpresí antigenu i na zdravých buňkách. To způsobí cytotoxickou reakci i mimo nádor a může způsobit významnou cytotoxicitu kdekoliv v organismu v závislosti na expresi antigenu. V minulosti, kdy probíhaly první studie s CAR-T a tyto informace nebyly detailně známy, došlo také k řadě fatalit. Např. CAR-T rozpoznávající CAIX target pro léčbu ca ledvin způsobily závažné poškození jater, nebo CAR-T specifické na Her2 způsobily plicní postižení s úmrtím. Bohužel pro léčbu solidních nádorů neexistuje ideální antigenní cíl (Ahmed et al., 2015; Lamers et al., 2013) a tyto projevy toxicity představují známé riziko. Klinicky ověřené antigenní cíle jsou uvedeny v Tab. 2. Přestože CD19 antigen je asi nejlepší a nejúčinnější antigen, tak i CD19 CAR-T poškozují zdravé tkáně – dojde k eliminaci všech B-lymfocytů a pacienti mohou rozvinout protilátkový imunodeficit, který však ale není trvalý a k reparaci B-lymfocytů obvykle dojde po vymizení účinku CAR-T.

### Eliminace nádorové buňky pomocí kombinace několika antigenů současně

Tento postup si klade za cíl kombinovat aktivaci CAR-T dvěma receptory současně, kdy k účinné stimulaci CAR-T dojde pouze v případě rozpoznání obou antigenů současně. Např. se zkoušejí CAR-T pro léčbu m. myelomu, které reagují s antigeny CD138 a CD38 a k aktivaci dojde pouze v případě rozpoznání obou antigenů. Tohoto efektu je docíleno tak, že CAR obsahuje dva receptory s oddělenými kostimulačními (CD28) a aktivačními (TCR zeta) doménami. V případě rozpoznání obou antigenů se oba receptory aktivují současně a mimikují tak aktivaci jako kdyby k ní došlo prostřednictvím jednoho receptoru. Tento koncept se také nazývá "AND/NOT logic-gated CAR-T cells" a jedná se o velmi zajímavý experimentální směr vývoje CAR-T (Savanur et al., 2021). Na rozdíl od vložení ON/OFF gate může být design CARů také upraven tak, že jeden receptor obsahuje dvě scFv a tyto tzv. tandemové CARy reagují na oba antigeny. Tento postup se používá k rozšíření reaktivity CAR-T a zabránění selekce antigen-neg. mutant, v současnosti probíhají klinické studie s tandemovými CARy např. proti anti-CD19 a anti-CD20 (Tong et al., 2020).

### Cílená eliminace CARů in vivo

Pro zvýšení bezpečnosti byly vyvinuty různé tzv. pojistky pro cílenou eliminaci CAR-T. Bohužel některé z vysoce účinných technologií, například využívající indukovatelnou kaspázu 9 na bázi rimiducidu (Zhou et al., 2015), nemohou být široce používány v klinických studiích kvůli omezené dostupnosti aktivátoru. Jiné účinné a klinicky ověřené bezpečnostní spínače mohou být také založeny na použití terapeutických protilátek proti povrchovým antigenům EGFR a CD20, které se cíleně vloží do CAR-T buněk spolu s DNA sekvencí kódující CAR. Co-exprese těchto antigenů pomocí CAR

konstrukt umožňuje rychlou eliminaci podávaných CAR-T buněk terapeutickými protilátkami cetuximabem a rituximabem (Sahillioglu & Schumacher, 2022) .

### Zvýšení perzistence CAR-T in vivo

Současným hlavním problémem CAR-T terapie je neúčinnost na solidní nádory v důsledku slabé expanze buněk po podání. I v případě CD19 CAR-T se postupně objevují data ukazující slabou expanzi buněk u některých pacientů a již se ví, že účinnost CD19 CAR-T velmi přesně koreluje s mírou expanze in vivo. Dále se prokázalo, že podání lymfodepleční chemoterapie (režim FluCy) je zcela nezbytné pro navození silné expanze CD19 CAR-T (Hirayama et al., 2019; Srivastava et al., 2021). Mechanismus lymfodeplece je následující – chemoterapie fludarabin – cyklofosfamid nejprve eliminuje lymfoidní populace v organismu a způsobí cytopenii. Reparační mechanismy hematopoezy následně aktivují proliferaci buněk v lymfatickém systému a v kostní dřeni řadou mechanismů a mj. také navodí zvýšenou produkci cytokinů stimulujících hematopoezu. Tyto cytokiny působí i na aplikované CAR-T a stimulují tak jejich expanzi in vivo. Lymfodeplece má bohužel několik velmi nežádoucích účinků – paralelně s expanzí lymfocytů dochází i k expanzi myeloidních supresorických buněk (monocyty/makrofágy), které tlumí protinádorové účinky CAR-T, podobně jako působí myeloidních supresorické buňky v nádorovém mikroprostředí. Dále lymfodeplece u části pacientů vede k rozvoji závažných dlouhodobých cytopenií v myeloidní řadě (neutropenie a trombocytopenie) pravděpodobně v důsledku již příliš vysoké toxicity fludarabinu u takto těžce předléčených pacientů (Korell et al., 2021) .

Hlavním biologickým nástrojem, který podporuje expanzi CAR-T in vivo jsou tedy cytokiny, a proto se intenzivně studují postupy, jak zvýšit protinádorové efekty CAR-T pomocí ko-exprese cytokinů podporujících proliferaci CAR-T. Asi nejzajímavějšími cytokiny z tohoto pohledu jsou IL-7 a IL-21. IL-7 je cytokin stimulující proliferaci T lymfocytů a používá se během výroby CAR-T. Rooney et al ukázali jak na myších modelech, tak i v klinické studii s GD2-specifickými CAR-T, že konstitutivně aktivní receptor pro IL-7 stimuluje expanzi GD2 CAR-T u pacientů s glioblastomem a tyto GD2 IL7R CAR-T nevyžadují aplikaci lymfodepleční chemoterapie (Shum et al., 2017) . Podobně se ukazuje, že CAR-T ko-exprimující IL-21 mají zvýšenou perzistenci in vivo a udržují si „stem-cell memory“ imunofenotyp (Štach et al., 2020). Nové typy CAR-T enhancované pomocí cytokinů IL-7 nebo IL-21 představují perspektivní strategie, jak zvýšit účinnost CAR-T terapie a eliminovat nutnost použití lymfodeplečních režimů.

### Rizika spojená s editováním genomu

Současné techniky genomového inženýrství umožňují několik typů modifikace buněčné DNA. Tyto postupy umožňují vložit do genomu nový gen (transgen) nebo narušit vybraný gen cílenou mutagenezí.

Vnášení nových genů se nejčastěji provádí pomocí lentivirových retrovirových vektorů (LV/RV). Navzdory tomu, že LV/RV vnášejí transgen náhodně do genomu, oba virové systémy se běžně používají a ukázaly jako bezpečné u tisíců pacientů léčených CAR-T buňkami specifickými pro CD19. Bohužel, produkce virových vektorů GMP je velmi komplikovaná kvůli rozsáhlým regulačním problémům a výroba je proto pomalá a nese extrémní náklady. Komplikovaná povaha výroby GMP LV/RV komplikuje a zpomaluje vývoj nových typů CAR-T buněk zejména v akademickém (Milone & O'Doherty, 2018). K překonání těchto omezení byly vyvinuty neviróvé systémy využívající transpozony, jako je Sleeping Beauty (SB) a piggyBac (PB) (Prommersberger et al., 2021). Oba transpozony vkládají geny také náhodně do genomu podobně jako virové vektory, i když byly popsány nepatrné rozdíly v integračním vzoru. Současně SB/PB transpozony jsou schopny vložit mnohem větší segmenty DNA než jakýkoliv virový vektor (Li et al., 2013). Tato velká kapacita nákladu umožňuje komplexní inženýrské přístupy, které vyžadují vložení více genů do jednoho vektoru. Schopnost vložit do genomu velkou sekvenci DNA by tak mohla umožnit generování CAR-T posíleného koexpresí cytokinů nebo více konstrukcí CAR a bezpečnostních pojistek nebo obsahujících komplexní expresní kazety s regulovanou aktivitou CAR-T. Genotoxicita způsobená náhodnou inzercí transgenu může být způsobena několika faktory, může dojít k vnesení transgenu do regulačních oblastí (promotor, enhancer) onkogenů a vysoká transkripční aktivita CAR transgenu může ovlivnit expresi blízkých genů. Dále může dojít vnesením transgenu do oblasti intronu/exonu ke vzniku mutace či knock-outu tohoto genu. Což v případě anti-onkogenů může mít opět onkogenní efekt.

Podobně jako inzerční onkogeneze způsobená náhodnou integrací transgenu, i mutageneze DNA prostřednictvím nukleáz DNA, jako je CRISPR-Cas9 nebo TALEN, představuje významné riziko pro vznik závažných mutací genomické DNA. Editace genů pomocí DNA nukleáz se nejčastěji používá pro produkci alogenních CAR-T buněk a je založena na narušení endogenních TCR alfa/beta řetězců cílenou mutagenezí (Maganti et al., 2022) nebo vypnutí inhibičních receptorů, jako je PD-1. Například v publikované klinické studii (Stadtmauer et al., 2020) autoři použili editaci CRISPR-Cas9 k eliminaci řetězců endogenních T buněčných receptorů (TCR) alfa a beta a k odstranění genu pro inhibiční receptor PD-1 pro zlepšení protinádorové imunity. Následně byl do takto upravený T lymfocytů vnesen pomocí lentivirového vektoru nový TCR specifický na nádorový antigen NY-ESO-1 a tyto buňky byly použity u HLA A2 pozitivních pacientů s refrakterními karcinomy, který exprimují NY-ESO-1. Tato zajímavá studie však neprokázala žádný významný pozitivní vliv narušení PD-1 na přežití in vivo podávaných T buněk, navíc byly v podávaných T buňkách detekovány významné chromozomální translokace. Navzdory tomu, že se jejich frekvence časem snižovala, tyto výsledky naznačují, že by mohlo dojít k závažným genomickým změnám. Zprávy z jiných klinických studií s alogenními CAR-T buňkami, jako je NCT04416984, vykazovaly podobné známky nežádoucí mutageneze také při použití systémů TALEN. V tomto případě byla studie ALPHA2 s alogenním CD19 CAR-T dočasně zastavena FDA kvůli jedinému případu pacienta se závažným nežádoucím účinkem souvisejícím s editací metodou

TALEN. (Locke FL, et al. Studie ALPHA2, J Clin Oncol. 2021;39(suppl 15):2529. Oba případy zásadně zvýšily regulační požadavky na testy kontroly kvality v jakýchkoli dalších klinických studiích využívajících technologii CRISPR-Cas9 nebo TALEN .

Na subcelulární úrovni bylo zjištěno, že generování dvouřetězcových zlomů DNA v důsledku editace pomocí CRISPR-Cas9 nebo TALEN může vést k širokému spektru chromozomálních strukturálních abnormalit a vést až k extrémním patologickým jevům jako je chromotripse. Chromotripse je mutační proces, při kterém dochází k seskupeným chromozomálním přestavbám lokalizovaným v části chromozomu (Leibowitz et al., 2021), V podstatě se jedná o rozpad části chromozomu, který se nepodaří správně opravit pomocí DNA reparačních procesů. Oblast poškozeného chromozomu se nejprve rozpadne na menší fragment, ty se následně amplifikují a náhodně složí zpět. Tyto důsledky jsou spojené s procesem onkogenní transformace nebo s vývojem vrozených onemocnění (Rosswog et al., 2021). Jiné studie podobně ukázaly, že editace globinu CRISPR-Cas9 může způsobit megabázové delece částí chromozómů, označované také jako ztráta heterozygoty (Boutin et al., 2021). Nukleázy CRISPR-Cas9 i TALEN tedy mohou způsobit významné genomické změny. Z pohledu regulačních institucí budou vyžadovány rozsáhlé testy bezpečnosti a kontroly kvality generovaných buněk pro schválení nových klinických studií s experimentálními terapeutickými produkty navrženými pomocí CRISPR-Cas9 nebo TALEN.

**Fig. 3**

**Hlavní metody genového inženýrství a porovnání jejich výhod a rizik.**

	<b>Viry (LV/RV)</b>	<b>Crispr/Cas9, TALEN</b>	<b>piggyBac transpozon</b>
<b>Výhody</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ověřená technologie</li> <li>• Umožňuje nízký počet kopií transgenu v buňce</li> <li>• Spolehlivý a jednoduchý postup transdukce</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nevirový postup</li> <li>• Umožňuje vložení genu do vybraného místa v genomu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nevirový postup</li> <li>• Jednoduché a stabilní komponenty</li> <li>• Rychlá produkce vektorů</li> <li>• Velká kapacita pro vnášení genů (přes 10kb)</li> <li>• Stačí BSL1 facilita</li> <li>• Cost-effective</li> </ul>
<b>Nevýhody</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BSL2 facilita pro výrobu</li> <li>• Riziko pro personál</li> <li>• Extrémní náklady pro GMP produkci vektorů (cca 1 mil USD)</li> <li>• Extrémně pomalá výroba vektorů (cca 1-3 roky )</li> <li>• Náhodná integrace do genomu</li> <li>• Omezená velikost DNA inzertu (1-2 malé geny)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Značná genotoxicita, vytváří chromozomální translokace/delece</li> <li>• Komplikovaný postup transfekce buněk</li> <li>• Složitý systém</li> <li>• Nízká účinnost integrace</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Náhodná integrace do genomu</li> <li>• Méně účinná výroba než u LV/RV</li> <li>• Vyšší počet kopií transgenu</li> <li>• Riziko genotoxicity</li> </ul>

## Výsledky

Hlavní zaměření prezentované práce souvisí s vývojem nových experimentálních CAR-T přípravků na hematologické malignity a realizací jejich klinického testování. Toto téma bylo řešené v grantech NT14030, NV15-34498A, NV19-08-00147 a Primus UK. Vědecké výstupy těchto projektů umožnily realizovat vývoj GMP certifikované výroby CD19 CAR-T. V roce 2021 bylo získáno v ÚHKT schválení pro klinickou studii s CD19 specifickými CAR-T buňkami "UHKT CAR19" (CART19 Cells Effects in Patients With Relapsed or Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphoma, NCT05054257). Tento experimentální přípravek UHKT CAR19 je vyráběný v GMP facilitě v ÚHKT a dosud bylo tímto přípravkem léčeno pět pacientů, jejichž analýzy jsou uvedeny níže. Tito pacienti nebyli způsobilí pro léčbu schválenými CAR-T, protože nesplňovali v době aplikace indikační kritéria (B-ALL pod 26 let a difuzní velkobuněčný B lymfom).

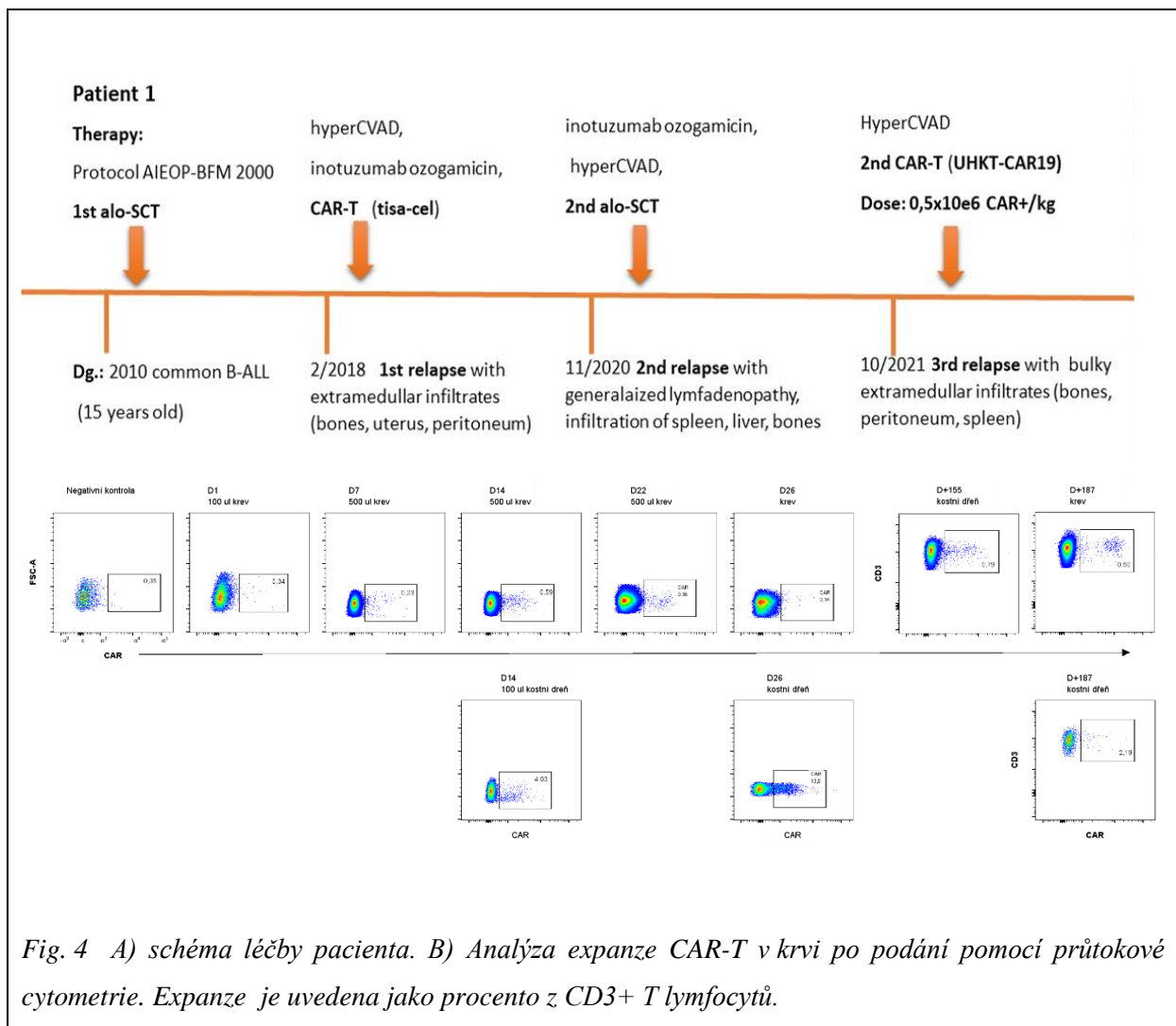
### Analýza pacientů léčených přípravkem UHKT CAR19

**Pacientka 1:** 27letá žena s refrakterním B-ALL, která zrelabovala po dvou alogeních transplantacích krvetvorby a po léčbě komerčními CAR-T (tisa-cel). Tato pacientka byla také prvním pacientem léčeným v České republice komerčními CAR-T buňkami. Po podání byly CAR-T detekovatelné v krvi průtokovou cytometrií cca 1 měsíc po léčbě a pacientka dosáhla dlouhodobé remise MRN neg. zatím v trvání 1 rok. **Pacient 2:** muž 39 let, s diagnózou folikulárního lymfomu, u kterého se po autologní transplantaci kmenových buněk rozvinulo rychle postupující chemorezistentní onemocnění z postižení krčních uzlin. PET/CT vyšetření prokázalo dosažení kompletní remise 30 dnů po léčbě, remise trvala cca 6 měsíců a pak došlo k dalšímu relapsu ve stejném místě jako bylo primární postižení. **Pacient 3:** 28letá žena s refrakterní B-ALL, která zrelabovala po dvou alogeních transplantacích krvetvorby. Po podání byla zjištěna významná populace CAR-T v krvi a také v kostní dřeni cca 1 měs. po léčbě. Tato pacientka dosáhla dlouhodobé MRD neg. remise zatím v trvání 6 měsíců. Všem těmto třem pacientům byla podána nízká dávka CAR+  $<0,5 \times 10^6$ /kg. **Pacient 4:** muž 57 let s primárně refrakterní B-ALL, který nedosáhl remise po intenzivní indukční chemoterapii. Po podání byla zjištěna významná expanze CAR-T v krvi a dosažení kompletní remise MRD neg., zatím v trvání cca 3 měsíce. Tento pacient je v současnosti indikován k alogenní transplantaci krvetvorby.



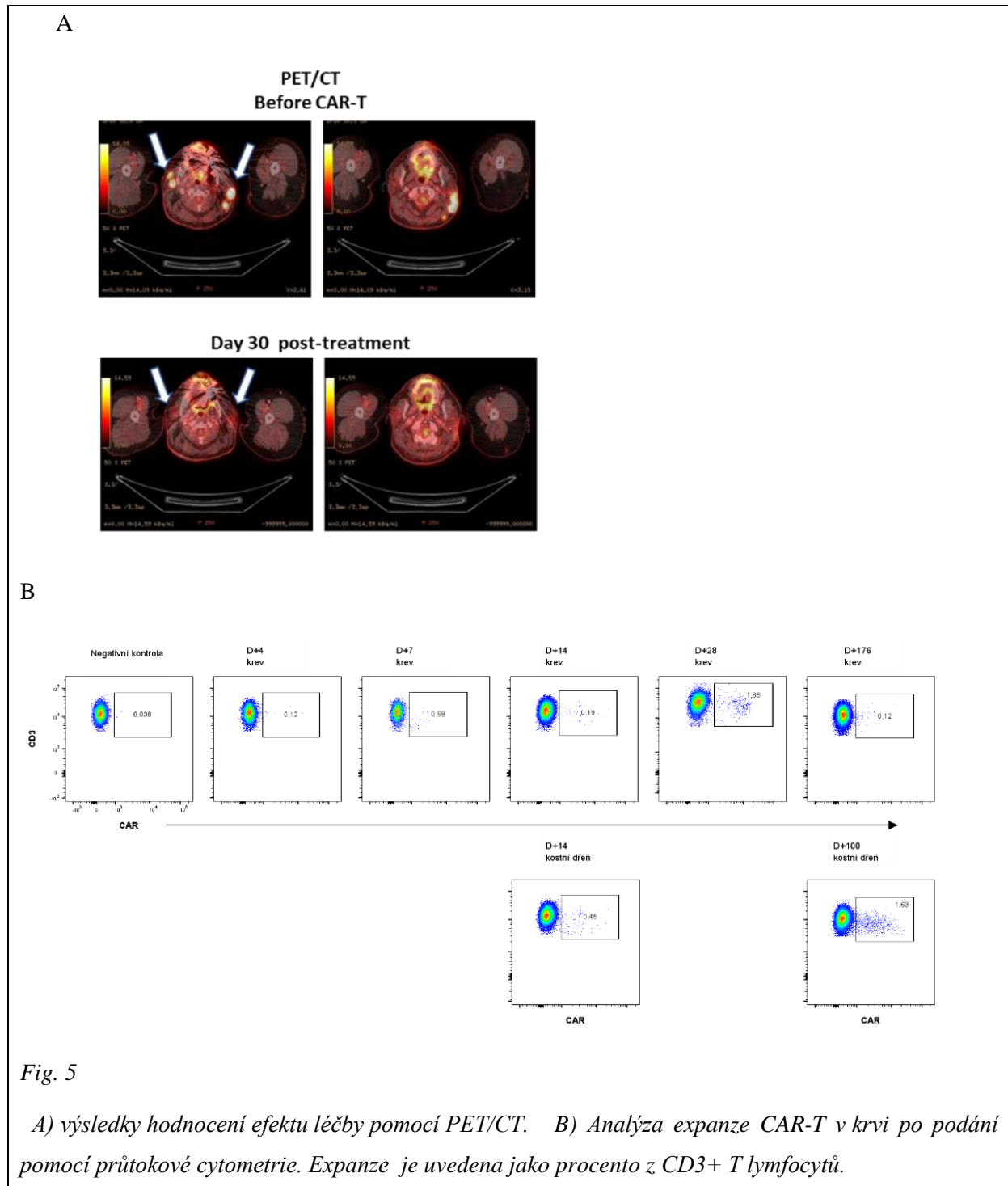
## Pacient 1

- Žena, 24 let, dg. B-ALL
- Opakované relapsy, stp. 2x alogenní transplantace krvetvorby
- Léčena komerčními CAR-T (tisa-cel) – relaps po 33 měsících, následně 2. aloSCT, a relaps po 11 měsících
- Léčena dávkou 0.5 x10e6/kg CAR-T
- Detekovatelná expanze CAR-T v krvi a kostní dřeni a jejich dlouhodobá perzistence
- Dosaženo MRD neg. CR, B-aplázie, dlouhodobá cytopenie při selhání štěpu (ANC < 0,5, PLT < 20, Hb < 80). stp. DLI
- Relaps 12 měsíců po léčbě CAR-T



## Pacient 2

- Muž, 39 let, dg. folikulární lymfom
- chemorefraktní relaps po ASCT
- rychle progredující krční lymfadenopatie bez známek transformace do DLBCL
- dávka 0.5x 10e6/kg CAR-T, mírné projevy CRS max. gr. 1
- detekovatelná expanze CAR-T v D28 v krvi, bez projevů cytopenie
- klinicky pozorovatelné regrese krční lymfadenopatie a dosažení kompletní remise dle PET/CT 1 měs. po léčbě
- relaps 7 měsíců po léčbě CAR-T, indikován k aloSCT



### Pacient 3

- Žena 28 let, dg. B-ALL
- Opakované relapsy, stp. 2x alogenní transplantace krvetvorby
- Léčena dávkou 0.2 x10e6/kg CAR-T
- Detekovatelná expanze CAR-T v krvi a kostní dřeni a jejich dlouhodobá perzistence
- Dosaženo MRD neg. CR, B-aplázie, jinak normální parametry KO,
- Relaps 10 měsíců po léčbě CAR-T

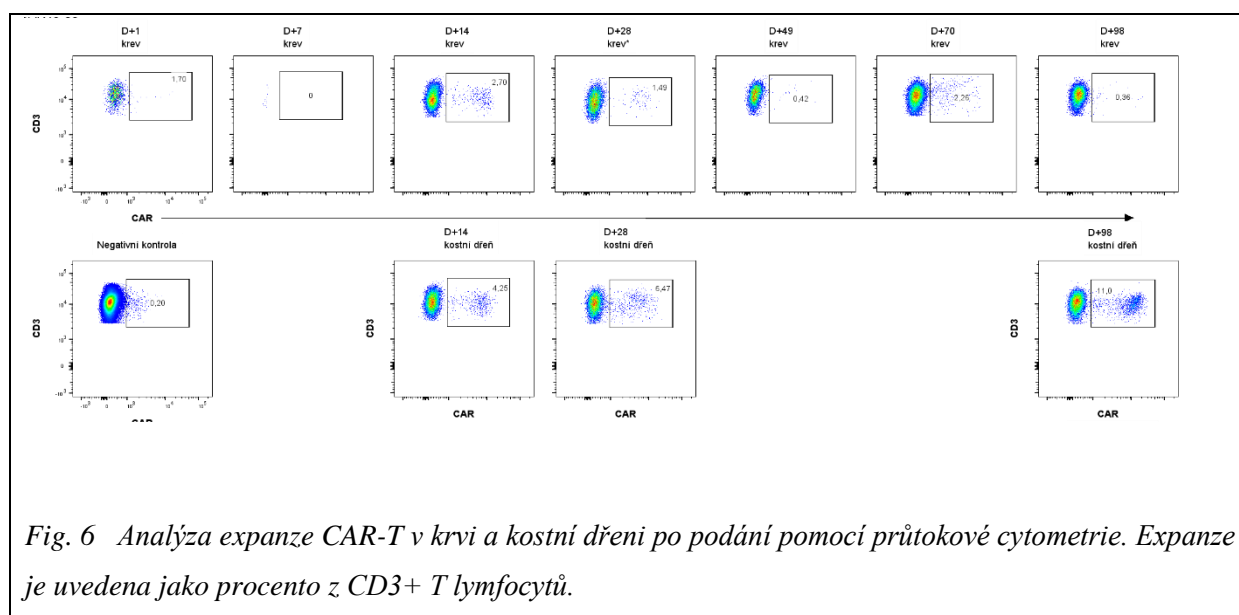
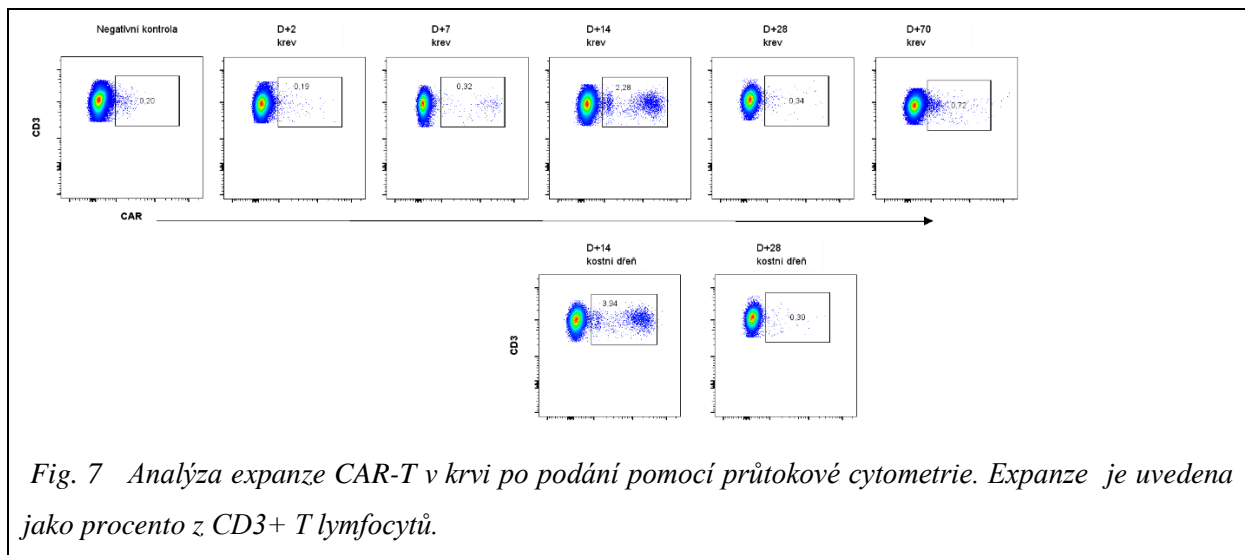


Fig. 6 Analýza expanze CAR-T v krvi a kostní dřeni po podání pomocí průtokové cytometrie. Expanze je uvedena jako procento z CD3+ T lymfocytů.

#### Pacient 4

- Muž 57 let, refrakterní B-ALL, pro nedosažení CR po 2. indukci nebylo možné indikovat k aloSCT
- Dávka  $1 \times 10^6$ /kg CAR-T,
- Vysoká expanze CAR-T v krvi 14 dnů po léčbě a dosažení MRD neg. CR
- Podstoupil aloSCT 3 měs. po léčbě



#### Zhodnocení účinnosti a toxicity přípravku UHKT CAR19

Tyto předběžné výsledky naznačují, že testovaný přípravek je účinný dle předpokladů a klinická studie proto stále probíhá. Během terapie UHKT CAR19 přípravkem nebyly zatím pozorovány žádné SAE ani DLT. Očekávanými NÚ byly projevy CRS, které dosahovaly max. grade 1. Byly pozorovány cytopenie - nejzávažnější u pacientky 1, u které došlo k selhání štěpu v důsledku hematotoxické terapie. Současně se dále ukázalo, že dostupnost schválených léčivých přípravků limituje počet pacientů indikovatelných pro tuto studii. Další důležitý faktor bylo věkové omezení ze strany SÚKLu na 18-65 let. V současnosti je většina pacientů s lymfomy často nad tímto věkovým limitem zejména proto, že jsou k dispozici i jiné velmi účinné léčivé přípravky jako jsou např. bisepecifické protilátky či kinázové inhibitory, které navodí remisi i po selhání mnoha linií léčby. Významná indikační skupina pro UHKT CAR19 jsou ale pacienti s B-ALL nad 25 let věku, kteří nesplňují indikační kritéria pro schválené LP tisa-cel a axi-cel. Pozitivním faktem je, že na základě těchto předběžných pozitivních výsledků byly SÚKLEM schváleny změny klinického protokolu, které umožnily zvýšit věkový limit na 80 let.

Do budoucnosti je však nezbytné nadále testovat a vyvíjet nové upravené CAR-T, protože výsledky klinických studií se schválenými přípravky ukazuje, že účinnost je cca 30% u pacientů s B-NHL - zbývá tedy stále dostatečný prostor pro vývoj nových vylepšených CAR-T. Tímto směrem se také ubírá současný translační výzkum CAR-T v ÚHKHKT - probíhá vývoj CAR-T specifických na antigen CD123 pro léčbu pacientů s AML a vývoj CD19 CAR-T enhancovaných cytokinem IL-21 a IL-7 pro pacienty, kteří zrelabují po komerčních CAR-T přípravcích.

### Imunomonitoring pacientů léčených přípravkem Kymriah

V průběhu 2020-2022 se sledovali pacienti léčení v ČR přípravkem Kymriah pomocí mnohobarevné průtokové cytometrie a měřila se řada parametrů které mohou mít vliv na účinnost terapie. Tyto parametry se týkají: 1) kvality vstupního materiálu pro výrobu CAR-T (tj. aferézy), 2) vlastností vyrobených CAR-T buněk, 3) expanze CAR-T buněk v organismu po aplikaci terapie. Pacienti indikovaní pro léčbu CAR-T jsou po mnoha liniích chemoterapie a obvykle mají různě závažné cytopenie jako důsledek toxicity terapie. V odebraných vzorcích aferézy byly stanoveny pomocí průtokové cytometrie základní leukocytární populace a byl sledován paměťový imunofenotyp T lymfocytů. Dále, podobnými analytickými metodami byly analyzovány vyrobené CAR-T přípravky pro jednotlivé pacienty a stanovilo se procento CAR+ buněk a jejich paměťový imunofenotyp. Po aplikaci CAR-T byli pacienti dále sledováni a v pravidelných intervalech se detekovala přítomnost CAR-T v periferní krvi, nebo v kostní dřeni. Změřené parametry se korelovaly s klinickým efektem léčby a se stavem onemocnění před zahájením CAR-T terapie. Výsledky jsou prezentovány v **publikaci 1** (Characterization of the input material quality for the production of tisagenleclucel by multiparameter flow cytometry and its relation to the clinical outcome. Štach et al) která je v současnosti v recenzním řízení.

Jedná se o skupinu pacientů s diagnózou B-ALL (n = 7) a DLBCL (n = 24), kteří byli léčení přípravkem tisa-cel v ÚHKHKT v VFH. Cílem bylo zjistit, jak intenzivní léčba pacientů ovlivňuje produkované CAR-T, jejich expanzi in vivo a výsledek léčby. Multiparametrická průtoková cytometrie byla použita k analýze materiálu použitého pro výrobu CAR-T (aferézy), samotného produktu CAR-T a stanovení expanze CAR-T ve vzorcích krve získaných ve třech časových bodech po podání. Byla provedena analýza paměťového fenotypu CD4/CD8 CAR-T lymfocytů (CD45RA, CD62L, CD27, CD28, CD57) a stanovena exprese inhibičních receptorů PD-1, TIM-3, TIGIT. Pacienti, kteří reagovali na léčbu, měli vyšší procento CD8+CD45RA+CD27+ T lymfocytů v aferéze, ale ne ve vyrobených CAR-T. Nejhorší výsledky měli pacienti s primárními refrakterními agresivními B-buněčnými lymfomy a s nedetekovatelnou expanzí CAR-T in vivo. Nicméně nebyla pozorována jasná korelace s imunofenotypem CAR-T. Výsledky naznačují, že důležitým parametrem předpovídajícím účinnost

terapie je úroveň expanze CAR-T in vivo a výsledek terapie CAR-T do značné míry závisí na biologických vlastnostech nádorů spíše než na imunofenotypu vyrobených CAR-T.

### Vývoj experimentálních CAR-T přípravků

V začátcích terapie CAR-T nebyly známy sekvence CD19-specifického scFv segmentu a jediným způsobem bylo tedy připravit vlastní scFv pomocí vyklonování scFv sekvence z hybridomu produkujícího CD19 specifickou monoklonální protilátku. Cesta vedoucí ke klinickému testování UHKT CAR19 proto začala vývojem vlastního CD19-specifického CARu (**Publikace 2:** Lenalidomide enhances antitumor functions of chimeric antigen receptor modified T cells, *Oncoimmunology* 2015). Během řešení grantu IGA byla vyklonována společně s kolegy z UMG sekvence kódující CD19-specifickou protilátku z hybridomu B2B a byl připraven nový CAR19 konstrukt. Funkčnost tohoto CARu byla následně otestována in vitro testy a na myších modelech pomocí nádorových B-buněčných linií. Současně byl popsán pozitivní efekt lenalidomidu na protinádorové účinky CAR-T. V té době byla metoda přípravy CAR-T založena na lentivirech, což se bohužel ukázalo jako zásadní komplikace, neboť ze strany SUKLu nám byly stanoveny nesplnitelné podmínky pro zavedení certifikované výroby CAR-T. Bylo tedy nutné vyvinout nevirový způsob přípravy CAR-T pomocí transpozonu piggyBac (**Publikace 3:** A new approach to CAR T-cell gene engineering and cultivation using piggyBac transposon in the presence of IL-4, IL-7 and IL-21, *Cytotherapy* 2018). Tento nevirový postup je založen na elektroporaci DNA plazmidů kódujících transpozony a transpozázu a má nižší riziko v souvislosti s pravidly práce s GMO (geneticky modifikované organismy). Tento popsáný postup přípravy CARů se později podařilo odcertifikovat a byl schválen SUKLEM. V další práci (**Publikace 4:** Inducible secretion of IL-21 augments anti-tumor activity of piggyBac-manufactured chimeric antigen receptor T cells. *Cytotherapy* 2020) se studoval efekt cytokinu IL-21 na zvýšení účinnosti funkce CAR19 T buněk. IL-21 je cytokin s pleiotropní funkcí, ovlivňující funkci řady typů krevních buněk. IL-21 potencuje perzistenci protinádorových cytotoxických T lymfocytů a udržuje je v méně diferencovaném stem-cell paměťovém fenotypu. Popsané CAR-T byly modifikované inducibilním promotorem s NFAT-regulačními segmenty, který zapne expresi a sekreci IL-21 po aktivaci CAR-T buněk. V další práci se dále vyvíjely nevirové metody přípravy CAR-T (**Publikace 5:** Enzymatically produced piggyBac transposon vectors for efficient non-viral manufacturing of CD19-specific CAR T cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2021). Publikace popisuje postup přípravy CAR-T, který využívá in vitro syntetizované DNA transpozony pomocí PCR a in vitro transkribovanou mRNA kódující transpozázu. Výhoda tohoto postupu je, že se jedná o tzv. abioticky připravené reagenty, což zjednoduší a zrychlí certifikaci vyráběného přípravku a sníží cenu přípravy transpozonových vektorů.

## Závěr

Předložená práce shrnuje výsledky výzkumu a vývoje protinádorových CAR-T lymfocytů cca od roku 2012. Během této doby se podařilo - v rámci řešení grantů IGA, AZV, Primus UK a za podpory ÚHKÚT dosáhnout několika stěžejních cílů. Předložené výsledky jsou kombinací základního, translačního a klinického výzkumu v oblasti CAR-T terapie hematologických malignit. Byl připraven originální CAR konstrukt specifický na antigen CD19, který se stal základem pro vývoj léčivého přípravku – CD19-specifických CAR-T, které jsou v současnosti testovány v klinické studii (NCT...) v ÚHKÚT u pacientů s r/r B-ALL a B-NHL. Pro tyto účely byl vyvinut nový a originální postup výroby těchto CD19 CAR-T pomocí neviróvé metody založené na transpozonu piggyBac. Dále byly sbírány zkušenosti s léčbou pomocí komerčních CAR-T přípravků (Kymriah) a byl prováděn imunomonitoring takto léčených pacientů pomocí průtokové cytometrie. Paralelně s tím dále probíhal výzkum a vývoj nových typů enhancovaných CAR-T buněk – byly připravené CD19 CAR-T enhancované pomocí ko-exprese cytokinu IL-21. Tyto CARy jsou jedním z hlavních kandidátů pro vývoj nového experimentálního přípravku pro pacienty refrakterní na komerční CD19 CAR-T přípravky.

## Přílohy

### Publikace 1

#### **Characterization of the input material quality for the production of tisagenleclucel by multiparameter flow cytometry and its relation to the clinical outcome**

Martin Štach, Robert Pytlík, Kristýna Šmilauerová, Jana Rychlá, Martin Mucha, Jan Musil, Abhishek Koladiya, Matěj Nemeč, Martina Petráčková, Iva Kaštánková, Pavla Pecherková, Lucie Šrámková, Kamila Polgárová, Marek Trněný, Petr Lesný, Jan Vydra and Pavel Otáhal

Pathology & Oncology Research, *accepted for publication*

### Publikace 2

#### **Lenalidomide enhances antitumor functions of chimeric antigen receptor modified T cells**

Otáhal P, Průková D, Král V, Fabry M, Vočková P, Latečková L, Trněný M, Klener P.

Oncoimmunology. 2015 Dec 3;5(4)

### Publikace 3

#### **A new approach to CAR T-cell gene engineering and cultivation using piggyBac transposon in the presence of IL-4, IL-7 and IL-21**

Ptáčková P, Musil J, Štach M, Lesný P, Němečková Š, Král V, Fábry M, Otáhal P

Cytotherapy. 2018 Apr;20(4):507-520

### Publikace 4

#### **Inducible secretion of IL-21 augments anti-tumor activity of piggyBac-manufactured chimeric antigen receptor T cells**

Štach M, Ptáčková P, Mucha M, Musil J, Klener P, Otáhal P

Cytotherapy. 2020 Dec;22(12):744-754.

### Publikace 5

#### **Enzymatically produced piggyBac transposon vectors for efficient non-viral manufacturing of CD19-specific CAR T cells**

Kaštánková I, Štach M, Žižková H, Ptáčková P, Šmilauerová K, Mucha M, Šroller V, Otáhal P

Mol Ther Methods Clin Dev. 2021 Aug 26;23:119-127.



## Literatura

- Abram, C. L., March, C. A. L., Abram, C. L., & Lowell, C. A. (2014). *The Expanding Role for ITAM-Based Signaling Pathways in Immune Cells*. 2007(December 2007). <https://doi.org/10.1126/stke.3772007re2>
- Ahmed, N., Brawley, V. S., Hegde, M., Robertson, C., Ghazi, A., Gerken, C., Liu, E., Dakhova, O., Ashoori, A., Corder, A., Gray, T., Wu, M. F., Liu, H., Hicks, J., Rainusso, N., Dotti, G., Mei, Z., Grilley, B., Gee, A., ... Gottschalk, S. (2015). Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) - Specific chimeric antigen receptor - Modified T cells for the immunotherapy of HER2-positive sarcoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33(15). <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.0225>
- Ausubel, L. J., Hall, C., Sharma, A., Shakeley, R., Lopez, P., Quezada, V., Couture, S., Laderman, K., McMahon, R., Huang, P., Hsu, D., & Couture, L. (2012). Production of CGMP-grade lentiviral vectors. *BioProcess International*, 10(2), 32–43.
- Auwah, D., Stern, L., Schrack, I., Kim, T. Y., Cohen, J., Urak, R., Huynh, C., Chang, W.-C., Forman, S. J., & Wang, X. (2021). Developing a Safer Anti-CD44v6 Chimeric Antigen Receptor T Cell Against Hematological Cancers By Mitigating on-Target Off-Tumor Toxicity. *Blood*, 138(Supplement 1). <https://doi.org/10.1182/blood-2021-153927>
- Biedermann, B., Gil, D., Bowen, D. T., & Crocker, P. R. (2007). *Analysis of the CD33-related siglec family reveals that Siglec-9 is an endocytic receptor expressed on subsets of acute myeloid leukemia cells and absent from normal hematopoietic progenitors*. 31, 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2006.05.026>
- Bishop, D. C., Caproni, L., Gowrishankar, K., Legiewicz, M., Karbowniczek, K., Tite, J., Gottlieb, D. J., & Micklethwaite, K. P. (2020). CAR T Cell Generation by piggyBac Transposition from Linear Doggybone DNA Vectors Requires Transposon DNA-Flanking Regions. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.12.020>
- Boutin, J., Rosier, J., Cappellen, D., Prat, F., Toutain, J., Pennamen, P., Bouron, J., Rooryck, C., Merlio, J. P., Lamrissi-Garcia, I., Cullot, G., Amintas, S., Guyonnet-Duperat, V., Ged, C., Blouin, J. M., Richard, E., Dabernat, S., Moreau-Gaudry, F., & Bedel, A. (2021). CRISPR-Cas9 globin editing can induce megabase-scale copy-neutral losses of heterozygosity in hematopoietic cells. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25190-6>
- Brentjens, R. J., Davila, M. L., Riviere, I., Park, J., Wang, X., Cowell, L. G., Bartido, S., Stefanski, J., Taylor, C., Olszewska, M., Borquez-Ojeda, O., Qu, J., Wasielewska, T., He, Q., Bernal, Y., Rijo, I. v, Hedvat, C., Kobos, R., Curran, K., ... Sadelain, M. (2013). CD19-Targeted T Cells Rapidly Induce Molecular Remissions in Adults with Chemotherapy-Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci Transl Med*, 5(177), 177ra38. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005930>
- Cooper, M. L., Choi, J., Staser, K., Ritchey, J. K., Devenport, J. M., Eckardt, K., Rettig, M. P., Wang, B., Eissenberg, L. G., Ghobadi, A., Gehrs, L. N., Prior, J. L., Achilefu, S., Miller, C. A., Fronick, C. C., O’Neal, J., Gao, F., Weinstock, D. M., Gutierrez, A., ... DiPersio, J. F. (2018). An “off-the-shelf” fratricide-resistant CAR-T for the treatment of T cell hematologic malignancies. *Leukemia*, 32(9). <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0065-5>
- Field, A.-C., Vink, C., Gabriel, R., Al-Subki, R., Schmidt, M., Goulden, N., Stauss, H., Thrasher, A., Morris, E., & Qasim, W. (2013). Comparison of lentiviral and sleeping beauty mediated  $\alpha\beta$  T cell receptor gene transfer. *PLoS One*, 8(6), e68201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068201>

- Georgiadis, C., Rasaiyaah, J., Gkazi, S. A., Preece, R., Etuk, A., Christi, A., & Qasim, W. (2021). Base-edited CAR T cells for combinational therapy against T cell malignancies. *Leukemia*, 35(12). <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01282-6>
- Ghafouri, S., Fenerty, K., Schiller, G., de Vos, S., Eradat, H., Timmerman, J., Larson, S., & Mead, M. (2021). Real-World Experience of Axicabtagene Ciloleucel and Tisagenlecleucel for Relapsed or Refractory Aggressive B-cell Lymphomas: A Single-Institution Experience. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 21(12). <https://doi.org/10.1016/j.clml.2021.07.002>
- Ghobadi, A., Aldoss, I., Locke, F. L., Mattison, R. J., Bhojwani, D., Maude, S. L., Dasgupta, P., Mullis, K. G., Kabakibi, A., Hamil, A. S., Leedom, T., Chrobak, K., McNulty, E., Davidson-Moncada, J. K., Cooper, M. L., & DiPersio, J. F. (2021). A Phase 1/2 Dose-Escalation and Dose-Expansion Study of the Safety and Efficacy of Anti-CD7 Allogeneic CAR-T Cells (WU-CART-007) in Patients with Relapsed or Refractory T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL)/ Lymphoblastic Lymphoma (LBL). *Blood*, 138(Supplement 1). <https://doi.org/10.1182/blood-2021-146841>
- Gomes-Silva, D., Srinivasan, M., Sharma, S., Lee, C. M., Wagner, D. L., Davis, T. H., Rouce, R. H., Bao, G., Brenner, M. K., & Mamonkin, M. (2017). CD7-edited T cells expressing a CD7-specific CAR for the therapy of T-cell malignancies. *Blood*, 130(3). <https://doi.org/10.1182/blood-2017-01-761320>
- Gregory, T., Cohen, A. D., Costello, C. L., Ali, S. A., Berdeja, J. G., Ostertag, E. M., Martin, C., Shedlock, D. J., Resler, M. L., Spear, M. A., Orlowski, R. Z., & Patel, K. K. (2018). Efficacy and Safety of P-Bcma-101 CAR-T Cells in Patients with Relapsed/Refractory (r/r) Multiple Myeloma (MM). *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-111419>
- Gross, G., Gorochov, G., Waks, T., & Eshhar, Z. (1989). Generation of effector T cells expressing chimeric T cell receptor with antibody type-specificity. *Transplantation Proceedings*, 21(1 I).
- Haydu, J. E., & Abramson, J. S. (2021). CAR T-Cell therapies in lymphoma: Current landscape, ongoing investigations, and future directions. In *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* (Vol. 7). <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2021.39>
- Hirayama, A. v., Gauthier, J., Hay, K. A., Voutsinas, J. M., Wu, Q., Gooley, T., Li, D., Cherian, S., Chen, X., Pender, B. S., Hawkins, R. M., Vakil, A., Steinmetz, R. N., Acharya, U. H., Cassaday, R. D., Chapuis, A. G., Dhawale, T. M., Hendrie, P. C., Kiem, H. P., ... Turtle, C. J. (2019). The response to lymphodepletion impacts PFS in patients with aggressive non-Hodgkin lymphoma treated with CD19 CAR T cells. *Blood*, 133(17). <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-887067>
- Huang, X., Guo, H., Tammana, S., Jung, Y., Mellgren, E., Bassi, P., & Zhou, X. (2009). Gene Transfer Efficiency and Genome-Wide Integration Profiling of Sleeping Beauty , Tol2 , and PiggyBac Transposons in Human Primary T Cells. *Molecular Therapy*, 18(10), 1803–1813. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.141>
- Hughes-Parry, H. E., Cross, R. S., & Jenkins, M. R. (2020). The evolving protein engineering in the design of chimeric antigen receptor T cells. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010204>
- Irving, B. A., & Weiss, A. (1991). The cytoplasmic domain of the T cell receptor  $\zeta$  chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell*, 64(5). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90314-O](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90314-O)

- Kakarla, S., & Gottschalk, S. (2014). CAR T cells for solid tumors: Armed and ready to go? *Cancer Journal (United States)*, *20*(2), 151–155. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000032>
- Klebanoff, C. A., Yamamoto, T. N., & Restifo, N. P. (2014). Immunotherapy: Treatment of aggressive lymphomas with anti-CD19 CAR T cells. *Nat Rev Clin Oncol*, *11*(12), 685–686. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.190>
- Kochenderfer, J. N., Wilson, W. H., Janik, J. E., Dudley, M. E., Stetler-Stevenson, M., Feldman, S. A., Maric, I., Raffeld, M., Nathan, D. A. N., Lanier, B. J., Morgan, R. A., & Rosenberg, S. A. (2010). Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood*, *116*(20). <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-281931>
- Korell, F., Schubert, M. L., Sauer, T., Schmitt, A., Derigs, P., Weber, T. F., Schnitzler, P., Müller-Tidow, C., Dreger, P., & Schmitt, M. (2021). Infection complications after lymphodepletion and dosing of chimeric antigen receptor t (Car-t) cell therapy in patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia or b cell non-hodgkin lymphoma. *Cancers*, *13*(7). <https://doi.org/10.3390/cancers13071684>
- Kuwana, Y., Asakura, Y., Utsunomiya, N., Nakanishi, M., Arata, Y., Itoh, S., Nagase, F., & Kurosawa, Y. (1987). Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *149*(3). [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(87\)90502-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(87)90502-X)
- Lamers, C. H., Sleijfer, S., van Steenbergen, S., van Elzaker, P., van Krimpen, B., Groot, C., Vulto, A., den Bakker, M., Oosterwijk, E., Debets, R., & Gratama, J. W. (2013). Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma With CAIX CAR-engineered T cells: Clinical Evaluation and Management of On-target Toxicity. *Mol Ther*, *21*(4), 904–912. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.17>
- Leibowitz, M. L., Papathanasiou, S., Doerfler, P. A., Blaine, L. J., Sun, L., Yao, Y., Zhang, C. Z., Weiss, M. J., & Pellman, D. (2021). Chromothripsis as an on-target consequence of CRISPR–Cas9 genome editing. *Nature Genetics*, *53*(6). <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00838-7>
- Li, X., Burnight, E. R., Cooney, A. L., Malani, N., Brady, T., Sander, J. D., Staber, J., Wheelan, S. J., Joung, J. K., McCray, P. B., Bushman, F. D., Sinn, P. L., & Craig, N. L. (2013). PiggyBac transposase tools for genome engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(25). <https://doi.org/10.1073/pnas.1305987110>
- Ma, G., Shen, J., Pinz, K., Wada, M., Park, J., Kim, S., Togano, T., & Tse, W. (2019). Targeting T Cell Malignancies Using CD4CAR T-Cells and Implementing a Natural Safety Switch. *Stem Cell Reviews and Reports*, *15*(3). <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09876-5>
- Maciocia, P. M., Wawrzyniecka, P. A., Philip, B., Ricciardelli, I., Akarca, A. U., Onuoha, S. C., Leguț, M., Cole, D. K., Sewell, A. K., Gritti, G., Somja, J., Piris, M. A., Peggs, K. S., Linch, D. C., Marafioti, T., & Pule, M. A. (2017). Targeting the T cell receptor  $\beta$ -chain constant region for immunotherapy of T cell malignancies. *Nature Medicine*, *23*(12). <https://doi.org/10.1038/nm.4444>
- Maganti, H. B., Kirkham, A. M., Bailey, A. J. M., Shorr, R., Kekre, N., Pineault, N., & Allan, D. S. (2022). Use of CRISPR/Cas9 gene editing to improve chimeric antigen-receptor T cell therapy: A systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Cytotherapy*, *24*(4). <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2021.10.010>

- Mamonkin, M., Rouce, R. H., Tashiro, H., & Brenner, M. K. (2015). A T-cell-directed chimeric antigen receptor for the selective treatment of T-cell malignancies. *Blood*, *126*(8). <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-629527>
- Mardiros, A., dos Santos, C., McDonald, T., Brown, C. E., Wang, X., Budde, L. E., Hoffman, L., Aguilar, B., Chang, W. C., Bretzlaff, W., Chang, B., Jonnalagadda, M., Starr, R., Ostberg, J. R., Jensen, M. C., Bhatia, R., & Forman, S. J. (2013). T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia. *Blood*, *122*(18), 3138–3148. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-474056>
- Milone, M. C., & O'Doherty, U. (2018). Clinical use of lentiviral vectors. In *Leukemia* (Vol. 32, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0106-0>
- Porter, D., Frey, N., Wood, P. A., Weng, Y., & Grupp, S. A. (2018). Grading of cytokine release syndrome associated with the CAR T cell therapy tisagenlecleucel. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 11, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0571-y>
- Porter, D.L., Levine, B.L., Kalos, M., Bagg, A., & June, C. (2011). PILOT STUDY OF REDIRECTED AUTOLOGOUS TCells ENGINEERED TO CONTAIN ANTI-CD19 ATTACHED TO TCR $\zeta$  AND 4-1BB SIGNALING DOMAINS IN. *N Engl J Med*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103849>.CD19
- Prommersberger, S., Reiser, M., Beckmann, J., Danhof, S., Amberger, M., Quade-Lyssy, P., Einsele, H., Hudecek, M., Bonig, H., & Ivics, Z. (2021). CARAMBA: a first-in-human clinical trial with SLAMF7 CAR-T cells prepared by virus-free Sleeping Beauty gene transfer to treat multiple myeloma. *Gene Therapy*, *28*(9). <https://doi.org/10.1038/s41434-021-00254-w>
- Ptáčková, P., Musil, J., Štach, M., Lesný, P., Němečková, Š., Král, V., Fábry, M., & Otáhal, P. (2018). A new approach to CAR T-cell gene engineering and cultivation using piggyBac transposon in the presence of IL-4, IL-7 and IL-21. *Cytotherapy*, *20*(4), 507–520. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.10.001>
- Pulè, M. A., Straathof, K. C., Dotti, G., Heslop, H. E., Rooney, C. M., & Brenner, M. K. (2005). A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Molecular Therapy*, *12*(5), 933–941. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.04.016>
- Rodrigues, A., M., P., & Coroadinh, A. (2011). Production of Retroviral and Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges in the Manufacturing of Lipid Enveloped Virus. *Viral Gene Therapy*. <https://doi.org/10.5772/18615>
- Romeo, C., & Seed, B. (1991). Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides. *Cell*, *64*(5). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90327-U](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90327-U)
- Rosswog, C., Bartenhagen, C., Welte, A., Kahlert, Y., Hemstedt, N., Lorenz, W., Cartolano, M., Ackermann, S., Perner, S., Vogel, W., Altmüller, J., Nürnberg, P., Hertwig, F., Göhring, G., Lilienweiss, E., Stütz, A. M., Korbel, J. O., Thomas, R. K., Peifer, M., & Fischer, M. (2021). Chromothripsis followed by circular recombination drives oncogene amplification in human cancer. *Nature Genetics*, *53*(12). <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00951-7>
- 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>

- Sahillioglu, A. C., & Schumacher, T. N. (2022). Safety switches for adoptive cell therapy. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 74). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.07.002>
- Savanur, M. A., Weinstein-Marom, H., & Gross, G. (2021). Implementing Logic Gates for Safer Immunotherapy of Cancer. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.780399>
- Scarfò, I., Frigault, M. J., & Maus, M. v. (2019). Car-based approaches to cutaneous t-cell lymphoma. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 9, Issue MAR). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00259>
- Shum, T., Omer, B., Tashiro, H., Kruse, R. L., Wagner, D. L., Parikh, K., Yi, Z., Sauer, T., Liu, D., Parihar, R., Castillo, P., Liu, H., Brenner, M. K., Metelitsa, L. S., Gottschalk, S., & Rooney, C. M. (2017). Constitutive signaling from an engineered IL7 receptor promotes durable tumor elimination by tumor-redirectioned T cells. *Cancer Discovery*, 7(11). <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0538>
- Srivastava, S., Furlan, S. N., Jaeger-Ruckstuhl, C. A., Sarvothama, M., Berger, C., Smythe, K. S., Garrison, S. M., Specht, J. M., Lee, S. M., Amezquita, R. A., Voillet, V., Muhunthan, V., Yechan-Gunja, S., Pillai, S. P. S., Rader, C., Houghton, A. M. G., Pierce, R. H., Gottardo, R., Maloney, D. G., & Riddell, S. R. (2021). Immunogenic Chemotherapy Enhances Recruitment of CAR-T Cells to Lung Tumors and Improves Antitumor Efficacy when Combined with Checkpoint Blockade. *Cancer Cell*, 39(2). <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.11.005>
- Štach, M., Ptáčková, P., Mucha, M., Musil, J., Klener, P., & Otáhal, P. (2020). Inducible secretion of IL-21 augments anti-tumor activity of piggyBac-manufactured chimeric antigen receptor T cells. *Cytotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.08.005>
- Stadtmauer, E. A., Frialetta, 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*. <https://doi.org/10.1126/science.aba7365>
- Strome, S. E., Martin, B., Flies, D., Tamada, K., Chapoval, A. I., Sargent, D. J., Shu, S., & Chen, L. (2000). Enhanced therapeutic potential of adoptive immunotherapy by in vitro CD28/4-1BB costimulation of tumor-reactive T cells against a poorly immunogenic, major histocompatibility complex class I-negative A9P melanoma. *Journal of Immunotherapy*, 23(4). <https://doi.org/10.1097/00002371-200007000-00006>
- Suresh, T., Lee, L. X., Joshi, J., & Barta, S. K. (2014). New antibody approaches to lymphoma therapy. *J Hematol Oncol*, 7, 58. <https://doi.org/10.1186/s13045-014-0058-4>
- Tang, X. Y., Sun, Y., Zhang, A., Hu, G. L., Cao, W., Wang, D. H., Zhang, B., & Chen, H. (2016). Third-generation CD28/4-1BB chimeric antigen receptor T cells for chemotherapy relapsed or refractory acute lymphoblastic leukaemia: A non-randomised, open-label phase I trial protocol. *BMJ Open*, 6(12). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-013904>
- Tettamanti, S., Biondi, A., Biagi, E., & Bonnet, D. (2014). CD123 AML targeting by chimeric antigen receptors: A novel magic bullet for AML therapeutics? *Oncot Immunology*, 3(5), 5–7. <https://doi.org/10.4161/onci.28835>

- Till, B. G., Jensen, M. C., Wang, J., Chen, E. Y., Wood, B. L., Greisman, H. A., Qian, X., James, S. E., Raubitschek, A., Forman, S. J., Gopal, A. K., Pagel, J. M., Lindgren, C. G., Greenberg, P. D., Riddell, S. R., & Press, O. W. (2008). Adoptive immunotherapy for indolent non-hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood*, *112*(6), 2261–2271. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-128843>
- Till, B. G., Jensen, M. C., Wang, J., Qian, X., Gopal, A. K., Maloney, D. G., Lindgren, C. G., Lin, Y., Pagel, J. M., Budde, L. E., Raubitschek, A., Forman, S. J., Greenberg, P. D., Riddell, S. R., & Press, O. W. (2012). CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: Pilot clinical trial results. *Blood*, *119*(17), 3940–3950. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-387969>
- Tong, C., Zhang, Y., Liu, Y., Ji, X., Zhang, W., Guo, Y., Han, X., Ti, D., Dai, H., Wang, C., Yang, Q., Liu, W., Wang, Y., Wu, Z., & Han, W. (2020). Optimized tandem CD19/CD20 CAR-engineered T cells in refractory/relapsed B-cell lymphoma. *Blood*, *136*(14). <https://doi.org/10.1182/blood.2020005278>
- Westin, J. R., Kersten, M. J., Salles, G., Abramson, J. S., Schuster, S. J., Locke, F. L., & Andreadis, C. (2021). Efficacy and safety of CD19-directed CAR-T cell therapies in patients with relapsed/refractory aggressive B-cell lymphomas: Observations from the JULIET, ZUMA-1, and TRANSCEND trials. In *American Journal of Hematology* (Vol. 96, Issue 10). <https://doi.org/10.1002/ajh.26301>
- Willier, S., Rothämel, P., Hastreiter, M., Wilhelm, J., Stenger, D., Blaeschke, F., Rohlf, M., Kaeuferle, T., Schmid, I., Albert, M. H., Binder, V., Subklewe, M., Klein, C., & Feuchtinger, T. (2021). CLEC12A and CD33 coexpression as a preferential target for pediatric AML combinatorial immunotherapy. *Blood*, *137*(8). <https://doi.org/10.1182/blood.2020006921>
- Wong, D. P., Roy, N. K., Zhang, K., Anukanth, A., Asthana, A., Shirkey-Son, N. J., Dunmire, S., Jones, B. J., Lahr, W. S., Webber, B. R., Moriarity, B. S., Caimi, P., & Parameswaran, R. (2022). A BAFF ligand-based CAR-T cell targeting three receptors and multiple B cell cancers. *Nature Communications*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27853-w>
- Wu, Y., Chen, D., Lu, Y., Dong, S. C., Ma, R., Tang, W. yan, Wu, J. qiu, Feng, J. F., & Wu, J. Z. (2022). A new immunotherapy strategy targeted CD30 in peripheral T-cell lymphomas: CAR-modified T-cell therapy based on CD30 mAb. *Cancer Gene Therapy*, *29*(2). <https://doi.org/10.1038/s41417-021-00295-8>
- Yusa, K., Zhou, L., Li, M. A., Bradley, A., & Craig, N. L. (2011). A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(4), 1531–1536. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008322108>
- Zhang, W., Stevens, B. M., Budde, E. E., Forman, S. J., Jordan, C. T., & Purev, E. (2017). Anti-CD123 CAR T-Cell Therapy for the Treatment of Myelodysplastic Syndrome. *Blood*, *130*(Supplement 1).
- Zhou, X., Dotti, G., Krance, R. A., Martinez, C. A., Naik, S., Kamble, R. T., Durett, A. G., Dakhova, O., Savoldo, B., Stasi, A. di, Spencer, D. M., Lin, Y. F., Liu, H., Grilley, B. J., Gee, A. P., Rooney, C. M., Heslop, H. E., & Brenner, M. K. (2015). Inducible caspase-9 suicide gene controls adverse effects from alloplete T cells after haploidentical stem cell transplantation. *Blood*, *125*(26). <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-628354>

