

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Terapia celular CAR-T

Ana Carolina Lopes Oliveira

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2020

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Terapia celular CAR-T

Ana Carolina Lopes Oliveira

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

**Orientador: Professora Associada, Doutora Maria Henriques
Lourenço Ribeiro**

2020

Resumo

A imunoterapia tem vindo a desempenhar um importante papel na área da oncologia. Existem várias estratégias que tentam aproveitar o poder do sistema imunológico para combater o cancro. Entre elas, a utilização de células CAR-T tem atraído fortes atenções.

A inovadora terapia celular CAR-T obteve resultados impressionantes em casos avançados de cancro, para os quais praticamente já não restavam opções terapêuticas e cujos prognósticos eram extremamente fracos. O considerável sucesso desta terapia em tumores hematológicos suscitou um grande interesse em torno da investigação e do desenvolvimento de mais e melhores terapêuticas com células CAR-T. O principal foco é obter uma terapia mais segura e eficaz, procurando alcançar um espectro de aplicações clínicas cada vez mais alargado.

Na presente monografia, são abordados inicialmente alguns fundamentos e noções de imunologia importantes à compreensão da imunoterapia em questão. É apresentado o conceito, a tecnologia e processo de produção inerentes a esta terapia avançada. Posteriormente, é abordada a sua aplicação clínica, sendo apresentados os produtos contendo células CAR-T já aprovados: *Kymriah*, *Yescarta* e *Tecartus*. São referidos aspetos de prescrição e de seleção do doente, assim como o protocolo de administração destes tratamentos, possíveis efeitos secundários e importantes medidas de gestão e minimização de riscos.

Por fim, exploram-se os principais desafios e perspetivas futuras da terapia. Esta apresenta diversas limitações, nomeadamente relacionadas com toxicidades, resistências, logística, custos e a menor eficácia em tumores sólidos. Atualmente, estão em desenvolvimento várias abordagens e estratégias promissoras para superar tais desafios e otimizar esta terapia.

Espera-se uma próxima geração de células CAR-T multifacetadas, oferecendo maior segurança e eficácia. Com o número crescente de ensaios clínicos avaliando a terapia para múltiplos alvos e doenças diferentes, é expectável um futuro no qual as células CAR-T se tornem uma opção terapêutica em muitas outras neoplasias e em patologias para além da oncologia.

Palavras-chave: Cancro; Imunoterapia; CAR-T; Recetor Antigénico Quimérico

Abstract

Immunotherapy has been playing an important role in the field of oncology. Several strategies try to harness the power of the immune system to fight cancer. Among them, the use of CAR-T cells has attracted great attention.

The innovative CAR-T cell therapy has achieved impressive results in advanced cases of cancer, for which there were practically no treatment options left and whose prognoses were extremely poor. The considerable success of this therapy in hematological tumors has raised great interest in the research and development of more and better therapies with CAR-T cells. The main focus is to obtain a safer and more effective therapy, seeking to reach a wider spectrum of clinical applications.

Initially, some fundamentals and notions of immunology that are important for understanding this type of immunotherapy are addressed in the present review. The concept, technology and production process inherent to this advanced therapy are presented. Afterwards, its clinical application is addressed and the already approved treatments containing CAR-T cells – *Kymriah*, *Yescarta* and *Tecartus* – are presented. Aspects of prescription and patient selection are mentioned, as well as the administration protocol of these treatments, possible side effects and important risk management and minimization measures.

Finally, the main challenges and future perspectives of the therapy are explored. This therapy has several limitations, namely related to toxicities, resistance, logistics, costs and lower efficacy in solid tumors. Currently, several promising approaches and strategies are being developed to overcome such challenges and optimize this therapy.

A next-generation of multifaceted CAR-T cells is expected, offering greater safety and efficacy. With the growing number of clinical trials evaluating this therapy for multiple targets and different diseases, we may expect a future where CAR-T cells become a therapeutic option in many other cancers and pathologies beyond oncology.

Keywords: Cancer; Immunotherapy; CAR-T; Chimeric Antigen Receptor

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Henriques Ribeiro, por toda a disponibilidade, prontidão e ajuda prestada, tanto na elaboração desta monografia, como durante todo o Mestrado Integrado, enquanto sua aluna.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e enorme esforço que fizeram para que hoje chegasse aqui. Ficarei eternamente grata pelos valores que me transmitiram, pelo exemplo de luta e trabalho constante.

Ao meu irmão, que sempre foi um exemplo de resiliência para mim. Agradeço a ajuda e paciência, especialmente durante estes anos em Lisboa, em que foi o meu “lar”.

Ao meu namorado, pela compreensão e tranquilização nos momentos mais críticos destes 5 anos. Pela motivação e apoio incondicionais.

Aos meus amigos e colegas, por caminharem ao meu lado e tornarem o percurso mais fácil e descomplicado.

A todos vós, muito obrigada!

Abreviaturas

aAPCs – Células apresentadoras de antígeno artificiais

ACT – Terapia celular adotiva

AICD – Morte celular induzida por ativação

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

APC – Célula apresentadora de antígeno

ASCT – Transplante autólogo de células estaminais

BCMA – *B-Cell Maturation Antigen*

BPF – Boas Práticas de Fabrico

BTK – Tirosina cinase de Bruton

CAR – Recetor antigénico quimérico

CE – Comissão Europeia

CR – Resposta completa

DEcH – Doença do enxerto contra hospedeiro

DCI – Denominação Comum Internacional

DLBCL – Linfoma difuso de grandes células B

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor*

EMA – *European Medicines Agency*

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

GD2 – *Disialoganglioside-2*

GPC3 – *Glypican-3*

HER2 – *Human Epidermal growth factor Receptor 2*

HSCT – Transplante de células estaminais hematopoiéticas

IFN- γ – Interferão-gama

IL – Interleucina

ITAMs – *Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*

LLA – Leucemia linfoblástica aguda

LNH – Linfoma não-Hodgkin

mAb – Anticorpo monoclonal

MCL – Linfoma de células do manto

MHC – *Major Histocompatibility Complex*

MRD – *Minimal Residual Disease*

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

MSLN – Mesotelina

NK – *Natural Killer*

ORR – Taxa de resposta global

OS – Sobrevivência global

PAES – *Post-Authorization Efficacy Studies*

PASS – *Post-Authorization Safety Studies*

PMBL – Linfoma primário do mediastino de grandes células B

PRIME – *Priority medicines*

RNA – Ácido ribonucleico

r/r – Recidivante ou refratário/a

scFv – Fragmento variável de cadeia simples

SLC – Síndrome de libertação de citocinas

SNC – Sistema nervoso central

TAAAs – Antígenos associados a tumores

T_{CM} – Célula T de memória central

TCR – Recetor de célula T

TILs – *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*

TME – Microambiente tumoral

T_N – Célula T “naïve”

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

TRAC – *T cell receptor α constant*

UE – União Europeia

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

Índice

1	Introdução	11
2	Objetivos	12
3	Materiais e métodos	13
4	Fundamento teórico	14
4.1	Imunoterapia em oncologia.....	14
4.1.1	O sistema imunitário	14
4.1.2	Células T	14
4.1.3	Estratégias de imunoterapia	16
5	Conceito	18
6	Tecnologia	20
6.1	O recetor CAR.....	20
6.1.1	Ectodomínio	20
6.1.2	Espaçador extracelular	21
6.1.3	Domínio transmembranar.....	21
6.1.4	Endodomínio	21
6.2	Produção de células CAR-T.....	23
6.2.1	Colheita e isolamento de células T.....	24
6.2.2	Ativação de células T	25
6.2.3	Transferência genética do CAR	25
6.2.4	Expansão	26
6.2.5	Formulação final	28
6.2.6	Garantia e controlo de qualidade.....	28
7	Aplicação clínica	30
7.1	Produtos aprovados	32
7.1.1	<i>Kymriah</i>	32
7.1.2	<i>Yescarta</i>	33
7.1.3	<i>Tecartus</i>	34
7.2	Prescrição, dispensa e administração	35
7.2.1	Seleção do doente.....	35
7.2.2	Consentimento informado	36
7.2.3	Formulação e posologia	37
7.2.4	Procedimentos para administração.....	38

7.3	Efeitos adversos.....	40
7.3.1	Farmacovigilância	43
8	Desafios e perspectivas futuras	44
8.1	Limitações	44
8.2	Estratégias	46
8.3	Alvos em estudo	49
9	Conclusões	50
	Referências Bibliográficas	51

Índice de Figuras

Figura 1.	Os três sinais necessários à ativação da célula T _N	16
Figura 2.	Imagem representativa do mecanismo de ação das células CAR-T.	18
Figura 3.	Estrutura geral do CAR e suas gerações.	23
Figura 4.	Representação esquemática do processo de obtenção de uma terapia CAR-T.....	24
Figura 5.	Principais etapas na produção de células CAR-T e exemplos de tecnologias e métodos disponíveis.....	27
Figura 6.	Múltiplos obstáculos às células CAR-T no microambiente de tumores sólidos.....	46
Figura 7.	Algumas estratégias da próxima geração de células CAR-T.....	48
Figura 8.	Principais tumores sólidos e respectivos TAAs em estudo com células CAR-T.	49

Índice de Tabelas

Tabela 1.	Dose, formulação e excipientes de cada produto CAR-T aprovado.	37
-----------	---------------------------------------------------------------------	----

1 Introdução

O cancro constitui um grave problema de saúde pública, sendo das principais causas de morbimortalidade, a nível global. Cancro ou tumor maligno é um termo que representa um vasto conjunto de doenças caracterizadas por um crescimento anormal e descontrolado de células, resultante do aparecimento de mutações no seu DNA que iniciam um processo de carcinogénese. Ao crescer descontroladamente, as células mutadas acabam por formar aglomerados chamados “tumores” ou “neoplasias”. Estes, à medida que se expandem e proliferam, podem invadir, lesionar ou destruir tecidos vizinhos, tornando-se malignos.

Atualmente, o aumento da incidência geral do cancro não é uma surpresa, tendo em conta a crescente esperança média de vida e o melhor diagnóstico efetuado. Tal facto provoca uma constante necessidade de procurar por mais e melhor terapêutica em oncologia. (1,2) Durante muito tempo, o tratamento do cancro passava, essencialmente, pela quimioterapia, radioterapia e cirurgia. Porém, falhas ou certos efeitos adversos destes tratamentos constituíam grandes desafios, aos quais a terapêutica direcionada e a imunoterapia vieram demonstrar resultados bastante promissores. A imunoterapia aplicada à oncologia visa fortalecer a capacidade natural do organismo no combate ao tumor, aumentando a eficácia das células do sistema imunitário, mobilizando-as e direcionando-as para um ataque específico. (3–5)

Entre as variadas estratégias de imunoterapia existentes, encontra-se a inovadora imunoterapia com células T CAR (ou CAR-T), isto é, linfócitos T que expressam um recetor antigénico quimérico (CAR). Em apenas três anos, a *Food and Drug Administration* (FDA) já aprovou três medicamentos de células CAR-T. Estes vieram trazer uma enorme esperança a muitos doentes com certos tipos de leucemia ou linfoma, que se encontravam em “fim de linha”, isto é, sem alternativas terapêuticas restantes. Em 2018, a *American Society of Clinical Oncology* nomeou a terapia CAR-T como o avanço do ano. (4) Além desta aplicação bem-sucedida na área da hemato-oncologia, centenas de estudos, baseados na tecnologia CAR-T, têm vindo a ser desenvolvidos. Estes têm como principal objetivo ver aplicada esta terapia a mais patologias, nomeadamente outras neoplasias malignas, ou até doenças infecciosas ou autoimunes, aperfeiçoando e modulando a tecnologia para tal fim. (6)

Torna-se, portanto, pertinente conhecer melhor as características desta promissora tecnologia, saber quais são as suas potencialidades, mas também limitações. Isto porque, apesar de tão revolucionária e com importante valor terapêutico para certos pacientes, a terapia celular CAR-T ainda apresenta desafios por superar.

2 Objetivos

O principal objetivo desta monografia é expor informação atualizada que possibilite conhecer e compreender a terapia com células CAR-T. Pretende-se abordar o seu modo de ação, sua produção e aplicabilidade clínica, apresentando os produtos autorizados até ao momento. Procura-se conhecer os principais passos no tratamento com esta modalidade terapêutica e possíveis toxicidades. Por fim, é ainda objetivo explorar o panorama atual nesta terapia, identificando potenciais limitações e prospeções futuras.

3 Materiais e métodos

Para a realização da presente monografia procedeu-se à pesquisa de artigos científicos, através de bases de dados como *PubMed*, *Google Scholar* e *ScienceDirect*, publicados entre 2001 e 2020. No entanto, deu-se especial preferência a artigos publicados nos últimos cinco anos. Após uma análise geral, foi selecionada informação relevante dos artigos mais pertinentes, face aos objetivos da monografia.

Informação complementar foi obtida de livros e de *websites*, nomeadamente dos seguintes organismos ou entidades: FDA, *National Comprehensive Cancer Network*, *European Medicines Agency* (EMA), *Gilead* e *Novartis*.

4 Fundamento teórico

4.1 Imunoterapia em oncologia

A imunoterapia veio revolucionar o tratamento oncológico, por constituir mais uma alternativa terapêutica em diversos tipos de tumores, superando certas limitações dos tratamentos convencionais. A imunoterapia apresenta a particularidade de tratar o cancro de um modo completamente distinto dos anteriores, ao ter como alvo direto o sistema imunitário, e não o próprio tumor. Isto é, a imunoterapia estimula o sistema imunológico para atacar as células cancerígenas, ao contrário, por exemplo, da quimioterapia, cujos agentes visam destruir diretamente as células malignas. (5) Deste modo, o principal objetivo da imunoterapia, na oncologia, é fortalecer a resposta imunitária contra as células tumorais, utilizando diversas estratégias diferentes. (6)

4.1.1 O sistema imunitário

O sistema imunitário assume um papel fundamental na manutenção da integridade do organismo. Tem uma função central no combate a infeções ou outras doenças “invasivas”, através dos sistemas inato e adaptativo, que cooperam entre si, para garantir uma resposta imunológica eficaz. (4) A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa, estando preparada para responder rapidamente. Reconhece e combate microrganismos ou células lesionadas, de forma pouco específica, compreendendo, por exemplo, células fagocíticas e *natural killer* (NK). A imunidade adaptativa (adquirida), pelo contrário, apresenta especificidade, conseguindo distinguir diferentes substâncias (antígenos). Além disso, mostra uma melhor e mais vigorosa resposta a exposições repetidas à mesma substância, habilidade conhecida por memória imunológica. A imunidade adaptativa é dividida em dois tipos: a humoral, mediada por anticorpos (produzidos por linfócitos B) e a celular (mediada por células), garantida pelos linfócitos T. (7,8)

4.1.2 Células T

As células T assumem diversas funções importantes ao nível do sistema imunitário, interferindo com outras células imunológicas, tanto da resposta inata como da adaptativa. Os linfócitos T conseguem efetuar um reconhecimento altamente específico e sensível de antígenos de diversos agentes patogénicos ou de lesões endógenas. Esta especificidade é-lhes

conferida pelo recetor de células T (TCR), molécula de superfície comum apenas a células T. Este recetor reconhece fragmentos de antígenos (peptídeos), apresentados pelo *Major Histocompatibility Complex* (MHC), o que provoca a ativação do linfócito.

O TCR é uma glicoproteína heterodimérica associada, na superfície da célula, ao complexo CD3, importante na transdução do sinal, após o reconhecimento do antígeno pelo TCR, para ativação do linfócito.

A interação entre o TCR e o MHC determina a diferenciação, função e ação do linfócito T, desde o seu inicial desenvolvimento no timo até ao seu estadió totalmente ativo, na periferia. Durante o desenvolvimento no timo, a célula T sofre um processo de diferenciação, adquirindo outro recetor de superfície característico, nomeadamente o CD4 ou o CD8.

Os linfócitos T auxiliares ou *helpers* (CD4+), têm uma função reguladora e estimulam o crescimento e proliferação dos outros linfócitos. São dos mensageiros mais importantes do sistema imunitário, pois interagem com os diversos leucócitos para o ataque imunológico. O TCR destes linfócitos reconhece peptídeos exógenos apresentados por moléculas de MHC-classe II, expressas por células apresentadoras de antígeno (APCs) específicas, como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B.

Os linfócitos T citotóxicos (CD8+) reconhecem MHC-classe I, presente em todas as células nucleadas. Estes linfócitos atacam as próprias células do organismo, que se apresentem “anormais”, lesionadas ou infetadas, podendo eliminar patógenos intracelulares, como vírus.

A interação entre linfócitos T e outras células é conhecida por sinapse imunológica, sendo que esta determina as diversas ações destas células. Na sinapse imunológica, a interação entre o TCR e o antígeno apresentado pelo MHC é o sinal primordial para ativação da célula T. Contudo, a interação TCR-antígeno-MHC é insuficiente para ativar uma célula T que não teve contato prévio com o antígeno - uma célula T “naïve” (T_N). É necessário haver um segundo sinal, que é a coestimulação. A principal molécula coestimulatória é o recetor CD28, presente nas células T. Este pode ter como ligandos as moléculas CD80 e CD86, presentes nas APCs. Se o TCR emparelhar sem haver coestimulação, a célula T torna-se anérgica ou sofre apoptose. É necessário ainda um terceiro sinal para completa ativação das células T, fornecido por citocinas. (Figura 1) As citocinas são moléculas que também atuam na sinapse imunológica, podendo ser libertadas por vários tipos de células e funcionam como mensageiros, atuando na própria célula que as produziu (autócrinas) ou noutras células vizinhas (parácrinas). O conjunto destes sinais vão ativar as células T e determinar a sua função efetora. (8–11)

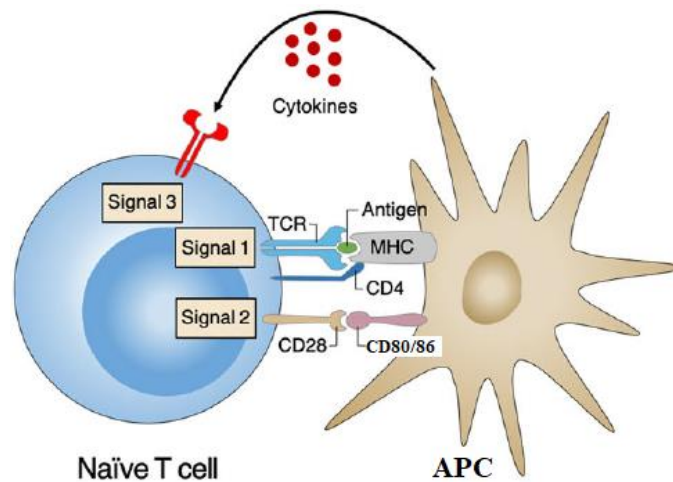


Figura 1. Os três sinais necessários à ativação da célula T_N.

A ativação completa de células T requer a sinalização pelo TCR (sinal 1), coestimulação (sinal 2) e sinalização por citocinas (sinal 3). Adaptado de (12)

4.1.3 Estratégias de imunoterapia

Sendo uma entidade dinâmica e geneticamente transformada, um tumor suscita um processo de eliminação imunológica que compreende ambos os sistemas inato e adquirido, no qual intervêm várias células e moléculas do sistema imunológico.

As células tumorais apresentam antígenos que permitem que as células imunitárias as reconheçam e desencadeiem uma resposta anti-tumoral. Estes antígenos associados a tumores (TAAs) podem ser antígenos presentes nos tecidos saudáveis, mas com elevada expressão nos tumorais; neo-antígenos resultantes de mutações somáticas; ou antígenos da linha germinativa do cancro.

Contudo, o processo de imunovigilância contra tumores é acompanhado de alterações na imunogenicidade dos mesmos (fenómeno de “*cancer immunoediting*”), devido à ocorrência de pressão seletiva. Os tumores têm capacidade de desenvolver resistência imunológica através de múltiplos mecanismos. Inibem, por exemplo, a ativação das células T, recrutando células supressoras e intensificando a via de *checkpoint* imunológico. Este microambiente imunossupressor conduz à anergia e disfunção das células imunológicas e à evasão do tumor.

Deste modo, reverter o estado de tolerância do tumor à deteção e ao ataque imunológico, constitui um dos principais focos da imunoterapia. Diferentes estratégias têm vindo a ser desenvolvidas com esse intuito. De um modo geral, estas atuam estimulando mecanismos efetores e/ou neutralizando mecanismos inibidores da resposta imunológica. (3,13,14)

Entre as estratégias de imunoterapia existentes, destacam-se: o uso de anticorpos, por exemplo os inibidores de *checkpoints* imunológicos; modificadores da resposta imunológica, como as citocinas; vírus oncolíticos; vacinas; e as terapias celulares adotivas (ACTs). (15)

Também conhecida por transferência adotiva de células, a ACT baseia-se na recolha de células imunológicas do doente, nomeadamente linfócitos T, sua manipulação e expansão *ex vivo* e, posteriormente, administração no doente para combater o tumor. A terapia pode ser autóloga, se a administração for de células do próprio doente, ou alogénica, se as células forem de um dador. A ACT consegue articular as propriedades anti-tumorais dos linfócitos com as valências da biotecnologia para superar a tolerância imunológica dos tumores. (3,14)

As principais formas de ACTs incluem os *tumor-infiltrating lymphocytes* (TILs), as células TCR-T e as células CAR-T. (16) Os TILs são linfócitos T naturalmente presentes em tumores metastáticos, que são isolados, ativados e expandidos em grande número, para voltarem a combater o tumor, mais eficazmente. As células TCR-T são células T projetadas para expressar um TCR específico, com especificidade para um antígeno alvo. Porém, até ao momento, a estratégia que mais impactou propriamente a terapêutica clínica foram as células CAR-T, constituindo o principal destaque das ACTs. (15,17)

5 Conceito

A terapia celular CAR-T consiste numa ACT com linfócitos T que são geneticamente modificados de modo a expressarem recetores antigénicos quiméricos (*Chimeric Antigen Receptors – CARs*) nas suas membranas celulares. É, simultaneamente, uma imunoterapia, terapia celular e terapia génica.

Os CARs são proteínas de fusão que possuem afinidade para um alvo tumoral específico. Tal propriedade deve-se ao ectodomínio destes recetores, que é derivado de um anticorpo monoclonal (mAb), sendo capaz de reconhecer um TAA de superfície com alta afinidade. Deste modo, obtêm-se células T com a especificidade de um mAb, permitindo direcionar e intensificar a atividade das mesmas para um determinado tumor.

O procedimento habitual nesta terapia começa com uma leucaferese, processo no qual se extraem linfócitos T do doente. Estas células T sofrem uma transferência genética de forma a codificarem o recetor CAR. As células CAR-T são então expandidas e administradas de volta ao paciente. Uma vez no doente, as CAR-T reconhecem o TAA alvo, formando uma sinapse imunológica, que leva à ativação das mesmas. Estas, em resposta, libertam citocinas e induzem citotoxicidade, nomeadamente através de perforinas e granzimas e da ativação de recetores de morte, como o Fas. Mais células imunológicas são recrutadas e as células tumorais sofrem lise ou apoptose. A ativação das CAR-T promove também a sua própria expansão e persistência, permitindo contínua vigilância imunitária e deteção de novas células alvo. (Figura 2) (18,19)

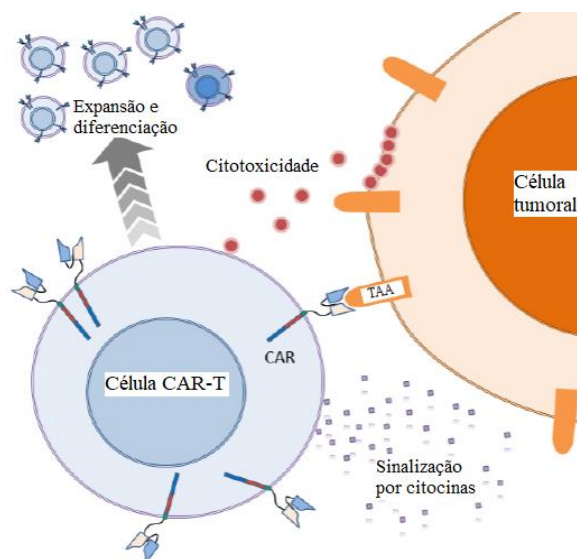


Figura 2. Imagem representativa do mecanismo de ação das células CAR-T.

Após interação CAR-TAA, a célula CAR-T liberta citocinas, com efeito autócrino e parácrino. A sua ativação provoca citotoxicidade, expansão e diferenciação. Adaptado de (20)

As células CAR-T podem permanecer no corpo meses a anos após administração, pois vão-se multiplicando e originando células de memória, ajudando a proteger contra a recorrência. (7,21) Assim, por muitos considerada uma “*living drug*”, esta terapia permite obter efeito terapêutico a longo prazo, com uma única administração.

Outra grande vantagem é que, ao contrário das outras ACTs referidas (TILs e TCR-T), as CAR-T, através do ectodomínio do CAR, reconhecem um antígeno de superfície, independentemente da apresentação pelo MHC, que se tem de verificar para os TCRs. Isto permite tratar inúmeros pacientes com a mesma doença, utilizando CARs “universais”.

Além disso, um dos mecanismos de escape à imunodeteção, das células malignas, é a regulação negativa da expressão de MHC, tornando-se estas “invisíveis” ao TCR/célula T. Assim, com o reconhecimento independente do MHC, as CAR-T ultrapassam essa limitação dos TCRs, possibilitando detetar e eliminar mais células cancerígenas.

Outro benefício, face ao TCR, é que o CAR reconhece uma grande variedade de antígenos, não só polipeptídeos, como também carboidratos, glicolípidos ou qualquer outra estrutura capaz de ser reconhecida por um anticorpo. (22) Esta expansão de alvos moleculares contribui para uma ampla aplicabilidade. As CAR-T também permitem ultrapassar a tolerância imunológica (anergia), devido à inclusão de mecanismos de coestimulação intrínseca, tornando-as menos vulneráveis aos efeitos de imunossupressão do tumor. (3,23)

Os CARs são construídos por engenharia genética. A sua natureza sintética permite atingir um largo espectro de TAAs e cancros, existindo, assim, várias construções de CARs, com domínios distintos.

6 Tecnologia

6.1 O recetor CAR

O *design* do recetor CAR evoluiu ao longo dos anos, à medida que o conhecimento sobre a ativação de células T e o microambiente tumoral (TME) melhorou, com o objetivo de aumentar a eficácia e a segurança da terapia. Ainda não existe uma configuração que seja considerada ideal ou universal. Portanto, a otimização do CAR permanece empírica, sustentada por testes em vários modelos pré-clínicos. (24,25)

A estrutura genérica de um CAR é modular, englobando quatro componentes principais: um ectodomínio, um espaçador extracelular, um domínio transmembranar e um endodomínio de sinalização. (Figura 3) (26)

6.1.1 Ectodomínio

O ectodomínio é o domínio extracelular de reconhecimento antigénico. Este permite atingir determinado TAA, expresso na superfície celular maligna. A variação deste domínio é, portanto, responsável pela especificidade do tratamento, pois modela a afinidade das células T para um alvo específico.

É composto, tipicamente, por um fragmento variável de cadeia simples (scFv) sintético (derivado de hibridoma de rato), que corresponde às regiões variáveis das cadeias pesada (V_H) e leve (V_L) de um mAb, unidas por um *linker* peptídico flexível. Assim se consegue conferir a alta especificidade e afinidade antigénica de um mAb ao CAR. (7,26,27)

A construção do scFv prediz a segurança e efetividade do CAR e, conseqüentemente, a resposta anti-tumoral. Estas dependem de vários fatores, tais como a afinidade para o antigénio, o comprimento do *linker* e a estrutura, localização e abundância do antigénio nas células tumorais. (24)

A seleção e identificação de um antigénio alvo é crucial para o desenvolvimento da engenharia CAR. Um antigénio ideal deveria ser expresso apenas nas células tumorais e ser essencial ao crescimento ou sobrevivência das mesmas. Infelizmente, alvos moleculares com tais características são invulgares, pois a expressão da maioria dos TAAs não está limitada às células malignas, havendo risco de efeitos indesejados em células de tecidos saudáveis. (22)

6.1.2 Espaçador extracelular

O espaçador extracelular (*hinge region*) conecta o ectodomínio ao domínio transmembranar. Este elemento assume grande influência na formação de uma sinapse imunológica eficaz, pois permite aumentar a flexibilidade do scFv. Conseqüentemente, reduz as restrições espaciais entre o CAR e o antigénio, orientando corretamente a sua ligação. (26)

O espaçador é um fragmento peptídico, tipicamente derivado da região Fc das imunoglobulinas IgG1 ou IgG4, ou de segmentos das moléculas de CD8 ou CD28. Além da composição, o comprimento do espaçador é outro fator a considerar no *design* do CAR, para obter uma distância ideal à interação entre as células. (22,28,29)

6.1.3 Domínio transmembranar

O domínio transmembranar assume um papel maioritariamente estrutural e de estabilização do CAR, ao “ancorar” o recetor na membrana plasmática. Além disso, afeta potencialmente a expressão do CAR e a sua associação com proteínas membranares, influenciando a ativação da CAR-T. (24,30)

Diferentes domínios têm sido utilizados, sobretudo derivados das moléculas CD3 ζ , CD8 ou CD28. A comparação funcional destas porções de membrana indica diversos efeitos de sinalização resultantes, contudo nenhuma avaliação-chave foi publicada acerca do domínio transmembranar mais favorável e eficaz em CARs. (22,28,29)

6.1.4 Endodomínio

O domínio de sinalização intracelular é responsável pela transdução do sinal e ativação da célula T, após reconhecimento do antigénio. Trata-se do domínio que sofreu maior evolução.

Tal como supracitado, a ativação completa de células T requer a interação antigénio-TCR/CD3 (sinal 1), coestimulação (sinal 2) e sinalização por citocinas (sinal 3). Os CARs foram concebidos para mimetizar a função do complexo TCR e evoluíram progressivamente para integrar sinais adicionais. (28)

A **primeira geração** de CARs, cujo design é o mais básico, continha um único domínio intracelular, tipicamente derivado da cadeia ζ do complexo TCR/CD3 (CD3 ζ). Após a ligação CAR-TAA, ocorre a fosforilação dos *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*

(ITAMs), presentes no domínio CD3 ζ , iniciando a cascata de ativação da célula T, ao desencadear uma série de vias de sinalização. Embora este endodomínio seja essencial à ativação da célula T, os CARs de primeira geração apenas forneciam o sinal 1 e revelaram uma eficácia anti-tumoral limitada em ensaios clínicos. Mostraram levar à anergia das células CAR-T, pobre secreção de citocinas, proliferação e persistência mínima *in vivo* e eventual apoptose. (22–24)

A **segunda geração** de CARs veio superar esse obstáculo, ao incluir um domínio coestimulador entre o domínio transmembranar e o CD3 ζ . Com este elemento adicional, o CAR passou a incluir também o sinal 2 (coestimulação), potenciando a ativação. Nestes, a coestimulação é fornecida em *cis*, em resposta ao mesmo sinal de ativação. Assim, as CAR-T contornam o requisito de se envolverem com ligandos coestimuladores exógenos para ativação, que podem estar ausentes no TME. Tal possibilitou uma maior expansão e persistência das CAR-T, com potente resposta clínica *in vivo*, superando significativamente a geração anterior. (17,23,31)

Endodomínios coestimuladores baseados nas moléculas coestimuladoras CD28 ou 4-1BB provaram ser particularmente eficazes, sendo os mais utilizados, até ao momento. Porém, outras moléculas têm sido estudadas, incluindo CD27, CD134, CD154 e CD278. (32) A utilização de diferentes domínios mostrou resultados distintos no perfil de secreção de citocinas, metabolismo, persistência e outros atributos funcionais das CAR-T. (4) Por exemplo, o domínio CD28 produz uma atividade anti-tumoral potente, com alta capacidade citolítica, secreção de IL-2 e glicólise, porém de curta duração. Já o 4-1BB está associado a maior persistência das CAR-T, metabolismo oxidativo aumentado, com menor exaustão e maior capacidade de gerar células T de memória central (T_{CM}). (29,30) Ao influenciar a cinética do controlo tumoral, a escolha dos domínios coestimuladores possibilita ajustar a resposta que se pretende das CAR-T, sua eficácia e persistência. (33)

Seguidamente, apareceu a **terceira geração**, que adiciona dois domínios coestimuladores distintos (por exemplo, CD28/4-1BB ou CD28/CD134) à região CD3 ζ , amplificando ainda mais o sinal. Esta geração demonstrou, em alguns estudos, uma resposta anti-tumoral mais forte e menor morte celular induzida por ativação (AICD), comparativamente à segunda geração. (22) Todavia, outros estudos revelam não haver superioridade. (34)

Mais recentemente, surgiu uma **quarta geração** de CARs, conhecidos por *armoured CARs*. Este combinam um CAR de segunda geração, com um conjunto de genes induzíveis de citocinas, ligandos coestimuladores ou enzimas. Este elemento adicional foi, assim, concebido

para fornecer à CAR-T uma vantagem de sobrevivência e/ou maior capacidade “tumoricida”. (21,27,35)

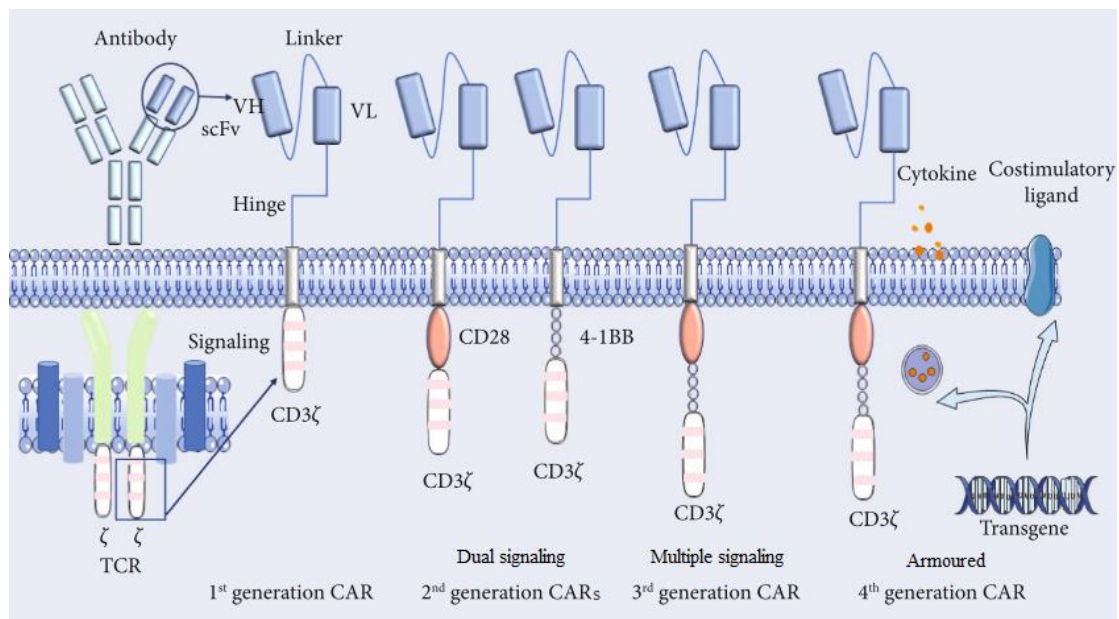


Figura 3. Estrutura geral do CAR e suas gerações.

Os CARs compreendem um domínio extracelular de reconhecimento antigênico (scFv), um espaçador (*hinge*), um domínio transmembranar, e um endodomínio de sinalização, que ativa a célula. O CAR de primeira geração contém apenas o domínio de sinalização CD3ζ. Os CARs de segunda e terceira geração adicionam, ao endodomínio, um ou dois domínios coestimuladores, respectivamente. A quarta geração acrescenta uma “cassete” de genes, para expressar elementos fortalecedores do efeito das CAR-T. Adaptado de (36)

6.2 Produção de células CAR-T

O processo geral de obtenção de células CAR-T segue os seguintes passos principais: leucaferese; isolamento, enriquecimento e ativação de células T; transferência genética do CAR; expansão das células CAR-T obtidas; formulação final do produto e testes de controle de qualidade. (Figura 4) (37,38)

Atualmente, a maioria das células CAR-T provêm de linfócitos autólogos. Geralmente, as células são colhidas num centro médico certificado e enviadas para uma instalação de processamento centralizado. Quando a produção é concluída, as células CAR-T são enviadas ao centro médico. A produção centralizada segue as Boas Práticas de Fabrico (BPF) atuais, tornando-se mais uniforme e permitindo maior qualidade e consistência entre os produtos. (39,40)

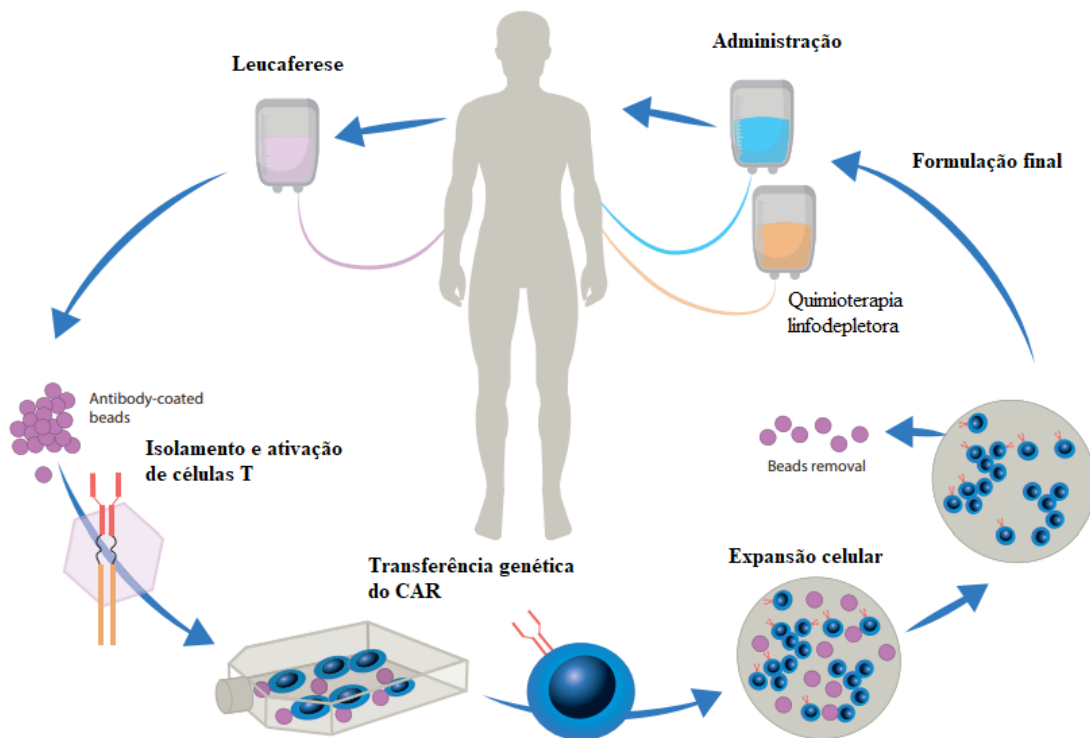


Figura 4. Representação esquemática do processo de obtenção de uma terapia CAR-T.
Adaptado de (41)

6.2.1 Colheita e isolamento de células T

O primeiro passo na produção de células CAR-T consiste na colheita de sangue periférico do doente, geralmente através de uma leucaferese. Este processo envolve a remoção do sangue, extração dos leucócitos, separados com base na densidade celular, e reinfusão dos restantes componentes sanguíneos.

O produto colhido é rico em células mononucleares do sangue periférico (células T, B, NK e monócitos), devido à semelhante densidade. Pode também conter alguns contaminantes, como plaquetas, hemácias, granulócitos e células tumorais circulantes. Todas estas células não-T poderão comprometer a produção a jusante, portanto é necessário purificar o produto da aférese. Assim, este deve ser enviado para a instalação de processamento, imediatamente após a colheita ou criopreservação. (39,42)

Para isolar as células T, faz-se primeiramente uma lavagem do produto para remover certos contaminantes, como o tampão de leucaferese. De seguida, é necessário o enriquecimento em linfócitos T, através de métodos como: separação por gradiente de densidade; elutriação; ou seleção com esferas magnéticas contendo anticorpos específicos para marcadores de superfície

celular T, como CD3, CD4 ou CD8, permitindo selecionar subtipos específicos de células T, obtendo, por exemplo, uma proporção definida de linfócitos CD4+:CD8+. (43,44)

O grau de diferenciação das células T pode afetar a qualidade do produto. Estudos pré-clínicos revelam que uma maior proporção de subtipos de linhagem precoce, como T_N, células T de memória estaminais (T_{SCM}) e T_{CM}, é vantajosa. Contudo, ainda não foi definida uma composição celular ótima. (26,37,45,46)

6.2.2 Ativação de células T

Antes da transferência genética, uma ativação celular é necessária. A ativação ideal deve levar à expansão suficiente das células, sem causar demasiada diferenciação ou AICD. (45)

In vivo, ambos os sinais 1 e 2 da ativação de células T são mediados por APCs. (44) Apesar das APCs endógenas mediarem essa ativação fisiológica, *ex vivo* apresentam variabilidade inerente, difícil aplicação laboratorial e clínica. (41) Por esse motivo, foram desenvolvidas estratégias simplificadas para uma ativação *ex vivo* mais padronizada e eficiente, utilizando por exemplo: mAbs anti-CD3 solúveis, com fatores de crescimento, como a IL-2; células apresentadoras de antígeno artificiais (aAPCs); esferas paramagnéticas revestidas com mAbs anti-CD3/anti-CD28. Esta última estratégia tem predominado, pois apresenta várias vantagens: minimiza a perda de anticorpos caros, visto estarem acopladas às esferas; ao se ligarem às células, as esferas podem ser usadas para seleção e ativação, não sendo necessário removê-las até à colheita, facilitando as etapas de lavagem e enriquecimento, e estimulando continuamente as células até o fim da expansão, podendo aí ser facilmente removidas da cultura por separação magnética. (43–45)

6.2.3 Transferência genética do CAR

As células T ativadas são então modificadas, de forma a expressarem o CAR. O gene que codifica o CAR de interesse (construído por engenharia genética) pode ser transferido por diferentes métodos. Atualmente, as principais estratégias utilizadas são os vetores de expressão γ -retrovirais e lentivirais, o sistema *transposon/transposase* e a transferência de RNA mensageiro (mRNA). Estes métodos diferem, essencialmente, no nível de expressão do CAR, estabilidade, eficácia clínica, segurança e custos. (44,45)

A transdução viral é o método mais comum, utilizando essencialmente vetores de γ -retrovírus e lentivírus. Estes entregam o gene CAR na forma de RNA, que é transcrito reversamente a DNA e integrado permanentemente no genoma da célula T. Este método permite elevada eficiência de transdução e expressão génica estável a longo prazo. Contudo, é trabalhoso e dispendioso, imunogénico, e tem o risco teórico de mutagénese insercional. Este risco resulta da natureza aleatória da integração do DNA no genoma hospedeiro, que pode resultar em transformação maligna. Este potencial oncogénico parece ser menor com vetores lentivirais, pois mostram um perfil de integração mais seguro. Contudo, nenhum caso de oncogénese mediada por vetores virais foi reportado na clínica com células CAR-T e os estudos clínicos confirmam persistência prolongada sem oncogénese, apoiando a segurança do uso destes vetores. (30,37,43–45)

O sistema *transposon*/transposase é um método baseado em plasmídeos contendo um *transposon* (sequência que codifica o transgene CAR) e uma transposase. Os plasmídeos são inseridos nas células T por eletroporação. Aí, a transposase faz a excisão do transgene e insere-o no genoma da célula T. Comparativamente à transfeção viral, este sistema tem uma produção mais simples e económica e é mais seguro. (21,44,45)

A transfeção de mRNA é outro método não viral. O mRNA transcrito *in vitro* é inserido nas células T, geralmente por eletroporação. Após tradução, as células T expressam eficazmente e transitoriamente (aproximadamente 1 semana) o CAR codificado. Ao contrário da expressão permanente verificada nas técnicas anteriores, esta expressão transitória do CAR pode ter a limitação de exigir várias administrações de CAR-T. Porém, pode representar uma vantagem significativa do ponto de vista da segurança, evitando certos efeitos adversos. Aliando estas características à facilidade de produção, este método torna-se útil para testar novas moléculas CAR. Além disso, não havendo integração genómica, o risco de genotoxicidade é minimizado. (31,37,46)

6.2.4 Expansão

As células CAR-T obtidas são expandidas em número, para atingir uma dose terapêutica. Vários instrumentos estão disponíveis (Figura 5) para cultura, nomeadamente:

Biorreator G-Rex – frasco de cultura composto por uma membrana permeável a gases na base, que permite a troca ideal de gases e o uso de grandes volumes iniciais de meio de cultura.

Assim, oxigénio ilimitado e nutrientes estão disponíveis para a crescente população de células, podendo atingir densidade máxima sem necessidade de trocar meios ou agitar a cultura.

Biorreator *Rocking-Motion* – tecnologia predominante. Contém uma bolsa (*cell bag*) estéril descartável, onde as células são cultivadas, e uma plataforma de balanço que a suporta. O movimento da plataforma induz ondas na cultura celular, permitindo a sua mistura e eficiente transferência de oxigénio. As bolsas anexam pequenos tubos que permitem a amostragem e um regime de perfusão – adição automática de nutrientes e remoção de resíduos. O *software* permite personalizar as condições de cultura (temperatura, velocidade de balanço, concentração de oxigénio, pH) e agendar a perfusão de meio. Sondas e controladores possibilitam uma monitorização em tempo real. Biostat® RM, WAVE Bioreactor™ e sistema Xuri™ são exemplos de biorreatores *Rocking-Motion* disponíveis.

Sistema CliniMACS Prodigy® – plataforma automatizada de solução única – combina todas as etapas da produção (seleção, ativação, transdução, expansão, lavagem e formulação final de células) num sistema totalmente fechado. Permite uma grande redução do tempo de fabrico, de mão-de-obra e, conseqüentemente, de custos.

Sistemas automatizados, controlados e de sistema fechado, em conformidade com as BPF, são cruciais para produção em larga escala. Estes possibilitam utilizar menores volumes de meio, menos mão-de-obra, reduzindo erros humanos, e minimizar o risco de contaminação microbiana. Permitirem simplificar o processo e melhorar a reprodutibilidade. (39,43,45–47)

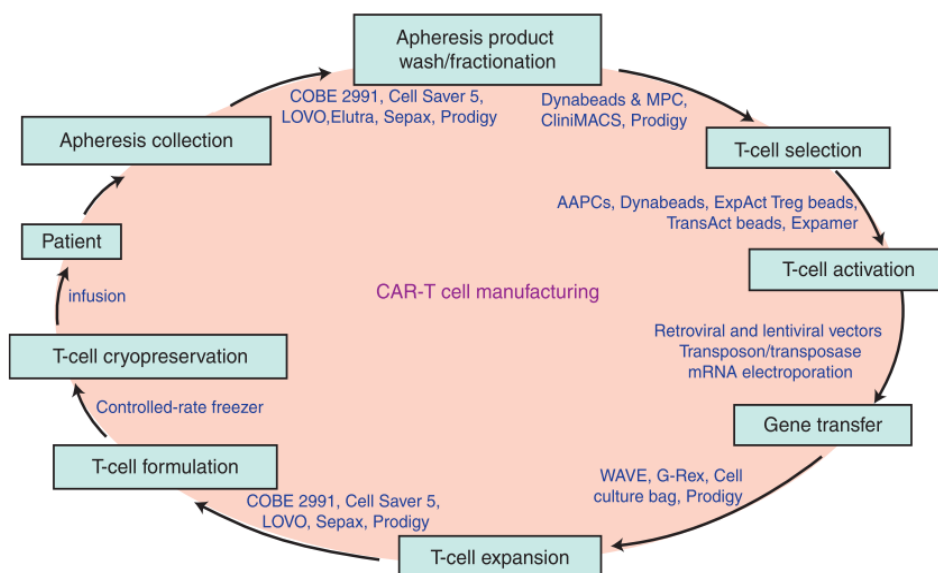


Figura 5. Principais etapas na produção de células CAR-T e exemplos de tecnologias e métodos disponíveis. Retirado de (46)

6.2.5 Formulação final

Atingida a contagem alvo de células CAR-T, estas são lavadas, para remover meio de cultura, fatores estimulantes ou eventuais esferas magnéticas, são concentradas para um volume adequado e suspensas em meio de perfusão. Geralmente adiciona-se um crioprotetor, nomeadamente dimetilsulfóxido, para criopreservação. A criopreservação (normalmente, em azoto líquido) permite armazenar as células durante o tempo necessário para os ensaios de liberação do lote e posterior envio. Após conclusão destes testes, e se os resultados atenderem aos critérios de libertação, as células são enviadas ao centro médico. Quando chegado ao centro, o produto é inspecionado para garantir que chegou em boas condições. As células são descongeladas e administradas ao paciente. (39,41,43)

6.2.6 Garantia e controlo de qualidade

A produção de células CAR-T de nível clínico cumpre vários requisitos para garantir um produto seguro e de qualidade. Todas as etapas mencionadas, desde a aférese até administração, são orientadas pelas BPF atuais. Existem várias especificações para garantia e controlo de qualidade, nomeadamente ao nível de condições ambientais, matérias-primas, reagentes, operadores, boas práticas de documentação e de distribuição.

Tratando-se de um produto autólogo, a rede de envio das células requer considerável atenção. Por vezes, o envio significa transporte para um continente diferente. Como tal, é crucial garantir um rastreamento inequívoco do produto de modo a evitar danos ou perdas. O transporte é feito em contentores validados, com temperatura e localização controladas por sensores. De igual modo, procedimentos de cadeia de custódia são essenciais. As células devem ser rotuladas com um número de identificação exclusivo e com identificadores do doente, para evitar incompatibilidade paciente-produto. Este controlo é de importância crítica, visto que a condição médica do paciente pode impossibilitar uma segunda leucaferese. (26,35,39)

Vários testes de controlo em processo e testes finais de libertação de lote são necessários para garantir que o produto celular cumpra os critérios de segurança, identidade, pureza e potência.

Os critérios de segurança são a esterilidade e ausência de vírus competentes para replicação (no caso de transdução viral). Exemplos de contaminantes são endotoxinas, micoplasma, bactérias e fungos.

A identidade das CAR-T é caracterizada pela expressão de marcadores de superfície por imunofenotipagem. Recomenda-se altos níveis de expressão do CAR e pureza do produto final (percentagens elevadas de células T CD3-positivas e CAR-positivas). (46) Frequentemente são realizados testes adicionais para avaliar a proporção de subconjuntos de células T, ajudando a prever a funcionalidade e persistência *in vivo*.

Embora existam diferentes métodos para testar a potência das células T, nenhum método padronizado está disponível, dificultando a comparação entre instituições, processos e produtos. Geralmente, as CAR-T são co-cultivadas com uma linha celular alvo e avalia-se a citotoxicidade (usualmente, por ensaio de libertação de cromo) e a secreção de citocinas, como o interferão-gama (IFN- γ). Modelos pré-clínicos animais podem ser usados para avaliar a potência *in vivo* das CAR-T, permitindo prever a segurança e a eficácia clínica das mesmas. (39,44,47,48)

7 Aplicação clínica

A terapia celular CAR-T tem apresentado resultados notáveis na prática clínica. A sua aplicação demonstrou maior sucesso em tumores hematológicos, mais especificamente na erradicação de células B malignas, utilizando células CAR-T direcionadas ao antígeno CD19. (49)

Desde 2010, vários ensaios clínicos demonstraram a capacidade de células CAR-T anti-CD19 promoverem respostas terapêuticas em neoplasias de células B. Taxas de resposta completa (CR) de até 90% foram obtidas em alguns desses ensaios. Estes resultados foram particularmente surpreendentes, tendo em conta que a maioria dos pacientes recrutados se encontrava numa fase avançada da doença, refratária a tratamentos padrão (ausência de resposta) ou em recidiva (recaída após remissão), geralmente sem opções terapêuticas restantes. (4,50)

Em agosto de 2017, havia aproximadamente 200 ensaios clínicos envolvendo células CAR-T no mundo. Desses, sensivelmente 65% envolviam neoplasias hematológicas, dos quais 80% utilizavam células CAR-T anti-CD19 direcionadas a câncros de células B. (36)

Existem várias razões para as neoplasias de células B serem o principal tumor alvo das CAR-T. Os câncros hematológicos têm a vantagem de se encontrarem nos locais típicos de migração das células imunes circulantes, facilmente acessíveis pelas células T, dando às CAR-T amplo e rápido acesso às células alvo. Especificamente, os câncros de linfócitos B são relativamente comuns e expressam vários marcadores de superfície celular típicos. Contêm, particularmente, a glicoproteína CD19 (ou antígeno linfocitário B), considerado um TAA seguro e quase ideal, tendo sido o mais bem-sucedido até ao momento. O CD19 é expresso em toda a linhagem de linfócitos B, mas não nas células estaminais hematopoiéticas. Tem expressão em células não-B extremamente limitada, sendo praticamente exclusivo das células B, benignas e malignas. Estando altamente expresso nas neoplasias destas células, a atividade anti-tumoral é maximizada, com toxicidade *on-target/off-tumor* mínima, já que a expressão em tecidos normais é confinada às células B. Assim, qualquer atividade no alvo/extra-tumor restringe-se à aplasia de células B, um efeito secundário esperado e controlável. (4,31,51–53)

Considerando o prognóstico sombrio dos pacientes, ainda que notando certas toxicidades, a resposta clínica obtida nos ensaios com CAR-T anti-CD19 foi substancial, com muitos deles atingindo remissão a longo prazo e potencial “cura”. Excelentes resultados, obtidos em casos

de leucemia linfoblástica aguda (LLA) ou de certos linfomas não-Hodgkin (LNH), agilizaram as aprovações, pela FDA, de três produtos distintos de CAR-T anti-CD19. (35,54)

A LLA consiste na rápida proliferação maligna de células precursoras dos linfócitos (B ou T), caracterizada por um excesso de linfoblastos. A maioria dos diagnósticos pediátricos (80-85%) têm origem B (LLA-B) e são CD19+. A LLA pode ocorrer a qualquer idade, porém cerca de 60% dos casos ocorre antes dos 20 anos (pico de incidência: 2-5 anos). Representa aproximadamente 25% dos diagnósticos de cancro em crianças menores de 15 anos.

Com o tratamento de primeira linha atualmente utilizado na LLA-B pediátrica, a taxa de sobrevivência aos 5 anos é elevada (90%). Contudo, 15 a 20% desses doentes recaem. Doentes com LLA recidivante ou refratária (r/r) têm opções limitadas de tratamento. A única potencial “cura” seria o transplante de células estaminais hematopoiéticas (HSCT). No entanto, este nem sempre é uma opção eficaz. Além disso, a maioria dos doentes com LLA-B r/r não consegue ser induzida à CR necessária para submissão ao HSCT. A LLA r/r continua a ser das principais causas de morte por cancro em crianças. Atingir remissão na LLA r/r permanece bastante difícil, acarretando longos períodos de hospitalização, com prognósticos bastante reduzidos em termos de esperança média de vida e qualidade de vida, havendo uma necessidade urgente de novas opções terapêuticas mais eficazes. (55–58)

O LNH é o tipo de neoplasia hematológica mais prevalente. Compreende mais de 60 subtipos, representando um grupo heterogêneo de distúrbios linfoproliferativos com origem maioritariamente em linfócitos B.

Os linfomas de células B são classificados clinicamente em indolentes ou agressivos, sendo que os agressivos representam cerca de 60% dos casos de LNH. O subtipo agressivo mais comum é o linfoma difuso de grandes células B (DLBCL), responsável por 30-40% dos LNH. O DLBCL é uma doença heterogênea com vários subtipos identificados. Normalmente surge de mutações em células B, embora também possa representar uma transformação de outros tipos de linfoma ou leucemia.

Existem outros LNH agressivos menos comuns, como por exemplo o linfoma primário do mediastino de grandes células B (PMBL). Este representa uma variante clínico-patológica do DLBCL, que se forma no mediastino, constituindo 2-4% dos casos de LNH.

Cerca de metade dos pacientes com estes LNH agressivos têm doença r/r (sensivelmente 30% recaem e 20% são refratários), sendo que o seu prognóstico é extremamente pobre. Os únicos tratamentos com potencial curativo seriam regimes de quimioterapia de resgate seguidos

de transplante autólogo de células estaminais (ASCT). No entanto, muitos doentes não cumprem critérios de elegibilidade (principalmente devido a idade avançada e/ou comorbilidades) ou não alcançam CR suficiente para efetuar ASCT e, daqueles que procedem ao transplante, 60% recidivam.

Os resultados uniformemente sombrios neste grupo de alto risco foram destacados no estudo retrospectivo SCHOLAR-1, que analisou 636 doentes com LNH agressivo r/r. Resultados demonstraram uma taxa de resposta global (ORR) de 26%, uma CR de 7% e uma sobrevivência global (OS) mediana de 6,3 meses, com as terapêuticas disponíveis. No geral, o prognóstico para doentes com LNH agressivo r/r era, assim, fraco e indicava uma clara necessidade médica não atendida, justificando novas estratégias de tratamento. (55,59–61)

7.1 Produtos aprovados

A imunoterapia celular CAR-T alcançou um marco significativo em 2017, ao se tornar uma opção terapêutica válida, com a aprovação pela FDA dos primeiros produtos contendo células CAR-T – *Kymriah* e *Yescarta*.

No final de junho de 2018, o Comité de Medicamentos para Uso Humano da EMA adotou um parecer positivo, recomendando a Autorização de Introdução no Mercado (AIM) de *Kymriah* e *Yescarta*. (62) A 23 de agosto de 2018, a Comissão Europeia (CE) concedeu AIM a ambos os medicamentos na União Europeia (UE). (63,64)

Muito recentemente, no presente ano de 2020, a FDA aprovou um terceiro produto celular CAR-T para uso humano – *Tecartus*.

Os três biofármacos contêm CARs de segunda geração, cujo alvo é o CD19. Estes foram aprovados com base nos impressionantes resultados obtidos em estudos clínicos, onde altas e duráveis taxas de remissão foram alcançadas. Mostraram-se notáveis no potencial para a sobrevivência a longo prazo de pacientes refratários aos tratamentos padrão ou recidivantes, com boa qualidade de vida e alta aceitação do doente. (65,66)

7.1.1 *Kymriah*

Kymriah, pertencente à *Novartis*, foi a primeira terapia CAR-T aprovada. Consiste numa dispersão para perfusão de tisagenlecleucel (ou CTL019) – células T autólogas modificadas

geneticamente *ex vivo*, através de um vetor lentiviral que codifica um CAR contendo o domínio coestimulador 4-1BB.

Kymriah tem indicação para o tratamento de:

1. Doentes pediátricos e jovens adultos até aos 25 anos de idade, com LLA de células B refratária, em recidiva após transplante ou em segunda recidiva ou posterior;
2. Doentes adultos com DLBCL r/r após duas ou mais linhas de terapêutica sistémica.

A aprovação da primeira indicação (LLA) teve por base os resultados obtidos no ensaio clínico ELIANA, financiado pela *Novartis* e realizado em colaboração com a Universidade da Pensilvânia e o Hospital Infantil da Filadélfia. Estudos iniciais de sucesso, reportando altas (>90%) e prolongadas taxas de CR na LLA, lançaram as bases para ELIANA, que avaliou a segurança e a eficácia do CTL019 nesta indicação. O estudo demonstrou uma ORR de 83%, com 63% de CR. A taxa de OS foi de 90% e 76%, respetivamente aos 6 e 12 meses. Tendo em conta o cenário de opções terapêuticas anteriores, tisagenlecleucel destacou-se. Os agentes blinatumomab e clofarabina, por exemplo, obtiveram ORRs de 33% e 20%, respetivamente. A alta e durável taxa de CR e a negatividade de MRD obtidas com tisagenlecleucel foram suficientemente notáveis para garantir a sua aprovação regular pela FDA, a 30 de agosto de 2017. (56,57,63,67)

O ensaio clínico JULIET foi a base para a segunda aprovação (DLBCL) de *Kymriah*. A análise de eficácia indicou uma ORR de 50% e 32,4% de CR, valores que se destacavam face aos evidenciados por SCHOLAR-1. Os *endpoints* de CR e sua durabilidade, considerados de benefício clínico, sustentaram a aprovação regular pela FDA de *Kymriah*, a 1 de maio de 2018, nesta segunda indicação terapêutica. (68)

Várias ferramentas regulatórias importantes fizeram parte da estratégia geral de desenvolvimento e aprovação das terapias CAR-T. *Kymriah* foi designado de “medicamento órfão”, tanto nos Estados Unidos da América (EUA) como na UE. Recebeu a designação de “*breakthrough therapy*” e de “doença pediátrica rara” pela FDA. Obteve também elegibilidade para *PRIME (Priority Medicines)* pela EMA, para a LLA. (69)

7.1.2 *Yescarta*

O axicabtagene ciloleucel (Axi-Cel, anteriormente KTE-C19) foi a primeira terapia CAR-T aprovada para o LNH e pertence à *Kite Pharma*, empresa adquirida pela *Gilead*. Corresponde

a células T autólogas alteradas por um vetor retroviral para expressar um recetor CAR, originalmente desenvolvido no *National Cancer Institute*, que inclui o domínio coestimulador CD28. (53)

Yescarta é indicado no tratamento de doentes adultos com DLBCL e PMBL, recidivantes ou refratários após duas ou mais linhas de terapêutica sistémica. (64)

O ensaio clínico ZUMA-1, financiado pela *Kite Pharma*, confirmou resultados de estudos menores anteriores e formou a base para a aprovação de Axi-Cel. Uma ORR de 72%, com 51% de CR, foi obtida. Remissões duráveis foram observadas e a OS aos 18 meses era de 52%. Estes resultados comparavam-se favoravelmente aos de SCHOLAR-1 e sugeriam um benefício clínico substancial, levando à aprovação regular pela FDA de *Yescarta*, a 18 de outubro de 2017. (60,61)

No seu cenário regulatório pré-aprovação, *Yescarta* também obteve designação de “medicamento órfão”, nos EUA e UE. Recebeu a designação de “*breakthrough therapy*” pela FDA e de PRIME pela EMA, no DLBCL. (69)

7.1.3 *Tecartus*

Tecartus (brexucabtagene autoleucel ou KTE-X19), o segundo produto CAR-T da *Kite Pharma* (*Gilead*) aprovado, contém células CAR-T cujo CAR é idêntico ao de *Yescarta* (utilizam o mesmo vetor retroviral). Estes produtos diferem ao nível do enriquecimento celular, no processo de fabrico. (70)

Tecartus foi aprovado pela FDA a 24 de julho de 2020, para o tratamento de doentes adultos com linfoma de células do manto (MCL) r/r.

O MCL é outra forma rara (6% dos casos) de LNH, envolvendo linfócitos B localizados na zona do manto do folículo linfoide, nos gânglios linfáticos. Tem uma progressão agressiva, espalhando-se rapidamente a outras áreas do corpo (envolvimento extranodal). A maioria dos doentes responde à terapia de primeira linha (geralmente, quimioterapia combinada com um mAb anti-CD20). Contudo, a recaída é a regra, com o prognóstico piorando progressivamente a cada recidiva. As terapias subsequentes variam amplamente consoante diversos fatores. Contudo, bendamustina com rituximab (mAb anti-CD20) é o tratamento preferencial no MCL r/r. Outras opções são, por exemplo, o HSCT para doentes elegíveis, esquemas quimioterápicos e agentes como bortezomib, lenalidomida, ou inibidores da tirosina cinase de Bruton (BTK).

Doentes com recidiva após estes agentes constituem um grupo de mau prognóstico, com taxas de CR tipicamente inferiores a 20% e sem opções restantes. O MCL r/r é altamente agressivo e, infelizmente, quase sempre fatal, compreendendo uma evidente necessidade médica não atendida. (70–72)

O estudo ZUMA-2 avaliou a segurança e eficácia do KTE-X19 no tratamento de adultos com MCL r/r. KTE-X19 foi administrado a 68 doentes, que haviam recebido anteriormente quimioterapia contendo antraciclina ou bendamustina, um mAb anti-CD20 e um inibidor de BTK (ibrutinib ou acalabrutinib), pelo menos. De 60 pacientes avaliáveis, a ORR foi de 87% e 62% alcançaram CR. Com base nestes resultados principais e na durabilidade da resposta, a FDA reconheceu a atividade clinicamente significativa de *Tecartus*, concedendo-lhe aprovação acelerada, baseada numa revisão prioritária.

A FDA atribuiu também as designações de “medicamento órfão” e de “*breakthrough therapy*” a *Tecartus*. Este recebeu a designação PRIME pela EMA e, neste momento, encontra-se sob revisão na UE. (71,73–75)

7.2 Prescrição, dispensa e administração

7.2.1 Seleção do doente

Até ao momento, não existem critérios de elegibilidade padronizados ou *scores* de comorbilidade para prever o sucesso ou as toxicidades desta terapia. Em grande parte, isso deve-se à heterogeneidade dos produtos CAR-T, cada qual agindo de diferente forma e consoante o estado da doença subjacente e vários fatores do doente. Como tal, a decisão de quem e quando encaminhar para esta modalidade permanece altamente individualizada e variável.

À exceção dos produtos já aprovados, o uso da terapia CAR-T permanece amplamente experimental. Assim, a maioria dos produtos são atualmente prescritos no contexto de ensaios clínicos, o que significa que a decisão de quando encaminhar um paciente para a terapia dependerá sobretudo da experiência do prescritor, dos ensaios disponíveis, bem como da concordância com os critérios necessários à inscrição no ensaio.

A maioria dos produtos CAR-T são estudados em situação de doença refratária ou recidivante múltipla, normalmente após pelo menos duas linhas de terapia anterior. Ou seja, por um lado, é uma terapia adequada às formas mais agressivas de determinados cancros, contudo, por outro lado, os doentes ainda têm de reunir certas condições mínimas. Um princípio geral ao

considerar qualquer paciente para a terapia é perceber se este conseguiria resistir às suas toxicidades mais severas, observadas até ao momento. Teria de suportar o *stress* fisiológico da síndrome de libertação de citocinas (SLC) ou a neurotoxicidade potencial. Existem certas populações onde se julga que estes riscos estejam aumentados. Por exemplo, doentes com desadequada função de órgãos ou com estado de *performance* insatisfatório podem ser incapazes de resistir à SLC grave e devem ser considerados para outras terapias.

De um modo geral, a maioria dos ensaios clínicos com CAR-T tem utilizado restrições ao nível de: esperança de vida; estado de *performance Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG); função renal, hepática, pulmonar e cardíaca; reservas da medula óssea; tratamentos prévios; presença de outras doenças ou estados patológicos, como infeções; estados fisiológicos, como gravidez ou amamentação.

Os produtos CAR-T atualmente aprovados não listam nenhuma contraindicação absoluta. Contudo, estes não foram estudados em várias populações especiais, por estas se inserirem nos critérios de exclusão dos respetivos estudos. Exemplos dessas populações são pacientes VIH positivos, doentes com envolvimento maligno do sistema nervoso central (SNC), entre outras. Como tal, o tratamento ainda não está estabelecido nestas populações, sendo necessários mais estudos que avaliem o perfil benefício-risco do produto nas mesmas. (18,76)

7.2.2 Consentimento informado

Devido à complexidade e potencial toxicidade da terapia, é importante a obtenção de um consentimento informado do paciente ou do seu representante, antes da decisão de optar pela mesma. Este elemento deve explicar, de forma compreensível ao doente, a justificativa para o uso da terapia, incluindo o seu benefício clínico, riscos e opções alternativas.

O paciente deve ser informado, detalhadamente, acerca do procedimento da terapia e das precauções necessárias, nomeadamente o acompanhamento a longo prazo. As toxicidades devem ser descritas, incluindo efeitos adversos teóricos. Requisitos práticos, como a necessidade de um cuidador e de residir nas proximidades da unidade de tratamento, também devem ser destacados. (77,78)

7.2.3 Formulação e posologia

Kymriah, *Yescarta* e *Tecartus* são dispersões para perfusão intravenosa de células CAR-T autólogas. A dose celular (Tabela 1) é administrada numa única perfusão.

As informações dos produtos referem um prazo de validade de 9 meses para *Kymriah* (armazenado e transportado a temperaturas $\leq -120^{\circ}\text{C}$) e de 12 meses para *Yescarta* e *Tecartus* (a temperatura $\leq -150^{\circ}\text{C}$). (55,63,64,70)

Tabela 1. Dose, formulação e excipientes de cada produto CAR-T aprovado. (63,64,73)

Produto (substância ativa – DCI)	Dose	Formulação e excipientes
<i>Kymriah</i> (Tisagenlecleucel)	<p><u>LLA</u></p> <p>Peso do doente:</p> <p>≤ 50 kg: $0,2$ a 5×10^6 células T CAR-positivas viáveis/kg de peso corporal</p> <p>> 50 kg: $0,1$ a $2,5 \times 10^8$ células T CAR-positivas viáveis (independente do peso)</p> <p><u>DLBCL</u></p> <p>$0,6$ a 6×10^8 células T CAR-positivas viáveis</p>	1 ou mais sacos de perfusão com: glucose, cloreto de sódio, solução de albumina humana, dextrano 40 para preparações injetáveis, dimetilsulfóxido, gluconato de sódio, acetato de sódio, cloreto de potássio, cloreto de magnésio, N-acetiltryptofanato de sódio, caprilato de sódio, alumínio, água para preparações injetáveis.
<i>Yescarta</i> (Axicabtagene ciloleucel)	2×10^6 células T CAR-positivas viáveis/kg de peso corporal (ou	Aproximadamente 68 mL de dispersão, num saco de perfusão com: CryoStor, cloreto de sódio e albumina humana.
<i>Tecartus</i> (Brexucabtagene autoleucel)	máximo de 2×10^8 células T CAR-positivas viáveis para doentes ≥ 100 kg)	

7.2.4 Procedimentos para administração

➤ Fase pré-administração (preparação)

Uma vez aprovada a indicação e decisão para a terapia, é agendada a leucaferese. Após leucaferese, ocorre um período de transição ou ponte, enquanto as células são produzidas. A duração deste período varia por produto, mas geralmente é da ordem das 2-4 semanas. Durante este período, os pacientes são vulneráveis à progressão da doença, sendo necessária uma frequente avaliação do seu estado para determinar qualquer complicação, necessidade de terapia de ponte ou atraso da administração das CAR-T. A terapia de ponte pode ser recomendada durante este período para estabilizar e controlar a carga da doença. A escolha desta terapia depende do histórico de tratamento anterior, carga da doença, idade e comorbilidades. Se possível, opta-se pelo regime com menor toxicidade. Muitos pacientes não precisarão desta terapia, contudo, para aqueles com doença progressiva, um único ciclo de quimioterapia costuma ser suficiente. (18,77,79)

Alguns dias antes da perfusão das CAR-T, os doentes recebem quimioterapia de condicionamento ou linfodepleção. A depleção linfocítica vai esgotar os linfócitos do doente, incluindo células T reguladoras (imunossupressoras), aumentando os níveis de citocinas estimuladoras de células T, como a IL-7 e IL-15. Cria-se, assim, um ambiente favorável à expansão e persistência das CAR-T.

A escolha da quimioterapia linfodepletora depende do produto celular e da doença. Atualmente, o regime mais usual é a combinação de ciclofosfamida com fludarabina, via intravenosa. (4,48,53,79)

A disponibilidade do produto CAR-T deve ser confirmada antes de iniciar o regime linfodepletor. Quanto a *Kymriah*, aconselha-se a sua perfusão 2 a 14 dias após o término da quimioterapia de linfodepleção, cujos regimes recomendados são:

- LLA – fludarabina (30 mg/m²/dia), durante 4 dias, e ciclofosfamida (500mg/m²/dia), por 2 dias, começando com a primeira dose de fludarabina;
- DLBCL – fludarabina (25 mg/m²/dia) e ciclofosfamida (250 mg/m²/dia), durante 3 dias. (63)

Para *Yescarta* e *Tecartus*, é recomendado um regime de ciclofosfamida (500 mg/m²/dia) e fludarabina (30 mg/m²/dia), nos 5º, 4º e 3º dias anteriores à perfusão dos mesmos. (64,73)

A linfodepleção pode ser prescindida, excepcionalmente, em casos particulares. Por exemplo, com *Kymriah* recomenda-se omitir a linfodepleção se a contagem de leucócitos for ≤ 1000 células/ μL , na semana anterior à perfusão. (63,77)

➤ **Administração**

A terapia deve ser administrada num centro clínico certificado e iniciada sob indicação e supervisão de um profissional de saúde com experiência no tratamento de cancros hematológicos e com formação em administração de produtos CAR-T e controlo de doentes tratados com os mesmos.

Tocilizumab, para uso em caso de SLC, e equipamento de emergência devem estar disponíveis antes da administração. O centro de tratamento deve ter acesso a doses adicionais de tocilizumab no prazo de 8 horas.

Antes da administração, é feita uma avaliação clínica. Devido aos riscos associados à terapia, a perfusão deve ser adiada se o paciente apresentar alguma das seguintes condições:

- Reações adversas graves não resolvidas (especialmente reações pulmonares, cardíacas ou hipotensão), incluindo de quimioterapias anteriores;
- Infecção ativa não controlada;
- Doença do enxerto contra hospedeiro (DEcH) ativa;
- Agravamento clínico significativo da carga ou rápida progressão da doença após quimioterapia de linfodepleção.

Cerca de 30 a 60 minutos antes da perfusão, os pacientes recebem pré-medicação com paracetamol e difenidramina (ou outro anti-histamínico H1), para minimizar potenciais reações agudas à perfusão.

A identidade do doente deve ser confirmada, certificando que corresponde aos identificadores do mesmo, no saco de perfusão.

Antes de descongelar, deve-se examinar o saco de perfusão quanto à presença de qualquer dano. O produto não deve ser irradiado.

O momento da descongelação do produto deve ser coordenado com o da perfusão. O produto é descongelado a 37°C (em banho de água ou a seco). Uma vez descongelado, deve ser mantido à temperatura ambiente (20-25°C) até à perfusão. Segundo as informações do produto, *Kymriah* deve ser administrado dentro de 30 minutos, para manter a viabilidade máxima. *Yescarta* e *Tecartus* são estáveis à temperatura ambiente até 3h após descongelação.

Para administração, recomenda-se o acesso venoso central. A totalidade do conteúdo do saco deve ser perfundida e o tempo total da perfusão não deve exceder 30 minutos. (63,64,73)

O paciente é monitorizado durante toda a administração. Sinais vitais são medidos e registados antes, durante e após a perfusão, em períodos definidos. (77,79)

➤ **Fase pós-administração (monitorização)**

Nos primeiros 10 dias pós-administração, é necessário monitorizar diariamente o doente quanto a sinais e sintomas da potencial SLC, eventos neurológicos e outras toxicidades. Durante este período, deve ser considerada a hospitalização. Após os 10 dias, o doente é monitorizado a critério do médico, tendo em conta a sua condição clínica.

Todavia, o paciente deverá permanecer próximo ao centro de tratamento (a cerca de 2 horas de viagem), por pelo menos 4 semanas após a perfusão. (63,64,76)

Um cuidador a tempo inteiro é crucial, para poder assistir o doente e entrar em contacto com os profissionais de saúde ao primeiro sinal ou sintoma preocupante. (77)

7.3 Efeitos adversos

A terapia CAR-T apresenta um perfil de toxicidade difícil de prever e avaliar, que pode variar consoante o produto, devido, sobretudo, ao CAR utilizado. (80)

Várias são as toxicidades relatadas com esta terapia, das quais se destacam as mais severas e potencialmente fatais: SLC e neurotoxicidade. Estas e outras possíveis toxicidades da terapia encontram-se abaixo descritas.

➤ **Síndrome de libertação de citocinas**

A SLC é o efeito adverso mais comum da terapia CAR-T e o mais prevalente após perfusão, ocorrendo normalmente 1 a 5 dias após a mesma.

Consiste numa resposta inflamatória sistémica, resultante da rápida ativação e proliferação das células T, havendo uma forte libertação de citocinas inflamatórias por várias células imunitárias, num curto espaço de tempo (“tempestade de citocinas”). Entre essas citocinas, destacam-se a IL-6, IFN- γ e fator de necrose tumoral α (TNF- α). (36,77,80)

A SLC pode apresentar um largo espectro de sinais e sintomas. Os quadros mais leves incluem sintomas semelhantes aos da gripe, como febre, arrepios, mialgias, cefaleia, fadiga e náuseas. Casos mais graves podem provocar taquicardia, hipotensão, hipóxia, citopenias,

coagulopatias, síndrome de ativação macrofágica/linfocitose hemofagocítica, insuficiência cardíaca, respiratória e renal, falência multiorgânica e morte. (41,73,81,82)

Acredita-se que os diferentes graus de intensidade da SLC estejam correlacionados com a carga tumoral. Geralmente, os pacientes com doença mais extensa têm maior probabilidade de apresentar SLC grave. (33,63,66)

A SLC ligeira normalmente é controlada apenas com cuidados de suporte, podendo envolver fluídos e oxigênio suplementares. Porém, os casos mais graves poderão requerer cuidados intensivos, como ventilação mecânica e tratamento com tocilizumab ou corticosteroides. (63,64,73)

Tocilizumab é um anticorpo monoclonal antagonista do recetor da IL-6, indicado no tratamento da artrite reumatoide, por bloquear a atividade desta interleucina, reduzindo a inflamação. Ao testar o seu uso na SLC, verificou-se uma rápida reversão dos sintomas e melhora clínica. Tocilizumab (*RoActemra*) foi, assim, aprovado pela FDA para o tratamento de doentes com SLC grave, induzida pela terapia CAR-T. (7,48,53,66)

➤ **Neurotoxicidade**

A toxicidade neurológica tem sido muito relatada na terapia CAR-T anti-CD19. Geralmente surge depois da SLC, ocorrendo aproximadamente 4 a 10 dias após a perfusão. (77,80)

Esta toxicidade provoca défices neurocognitivos. (35) Pode verificar-se um declínio cognitivo subtil, normalmente reversível, contudo há possibilidade de progredir para quadros potencialmente fatais. (48) As manifestações mais comuns de neurotoxicidade incluíram encefalopatia, cefaleia, tremor, tontura, afasia, ataxia, confusão, delírio, convulsões e ansiedade. Eventos graves ou fatais, como edema cerebral, ocorreram.

O mecanismo fisiopatológico subjacente à neurotoxicidade não está totalmente conhecido. Pensa-se que possa estar correlacionado com a elevação agressiva de citocinas, provocando disfunção endotelial no SNC e alteração na permeabilidade da barreira hematoencefálica, ou com a mobilização das próprias células CAR-T para o SNC.

Cuidados de suporte, administração de anticonvulsivantes/antiepiléticos (por exemplo, levetiracetam) e corticosteroides são recomendados na gestão das neurotoxicidades. Devido aos possíveis eventos neurológicos, os pacientes não devem conduzir, operar máquinas ou realizar atividades que requeiram especial atenção nas 8 semanas após perfusão. (4,63,64,73,80,83)

➤ **Toxicidade no alvo/extra-tumor**

Como a expressão da maioria dos TAAs não é limitada às células tumorais, a terapia CAR-T pode também destruir células saudáveis que expressem o antígeno alvo. (22) As reações adversas resultantes deste dano a tecidos normais são conhecidas por toxicidades *on-target/off-tumor* e podem representar risco de vida, especialmente quando células de tecidos essenciais (como cardíaco, pulmonar ou hepático) expressam o antígeno alvo. (84,85)

No caso da terapia CAR-T anti-CD19, há eliminação a longo prazo das células que expressam o antígeno CD19, independente de serem malignas ou normais, causando aplasia de células B profunda e prolongada. (24) A depleção de linfócitos B é, assim, um efeito esperado nesta terapia, frequentemente associada a hipogamaglobulinemia, condição em que se verifica um baixo nível de imunoglobulinas (anticorpos) no sangue. Esta toxicidade pode ser eficazmente controlada através de administração de imunoglobulinas, como terapia de substituição, e de profilaxia antibiótica, devido ao risco de infeções aumentado. (63,64,73,84)

➤ **Reações de hipersensibilidade**

Durante ou após a perfusão podem ocorrer reações alérgicas, incluindo reações graves como anafilaxia. As reações associadas à perfusão geralmente devem-se aos excipientes do produto, nomeadamente ao dimetilsulfóxido, presente na maioria dos crioprotetores. O paciente deve ser monitorizado cuidadosamente durante a administração e nos primeiros minutos após a mesma, quanto ao desenvolvimento de reações agudas. (63,64,73)

Reações anafiláticas, embora raras, podem também acontecer como resultado da reação imunológica contra as CAR-T. Esta rejeição pode ser devida ao facto de o scFv do CAR ser derivado de mAbs de rato, tendo potencial imunogénico. A humanização dos componentes do CAR poderá combater este efeito. (7,80,86)

➤ **Genotoxicidade**

Tal como referido em 6.2.3, existe um risco teórico de desenvolvimento de doença maligna secundária, com base no potencial de mutagénese insercional nas células modificadas com vetores retrovirais. A integração de transgenes perto de proto-oncogenes pode ativá-los, havendo potencial mutagénico das células transduzidas. (37)

Apesar de nenhum caso de transformação maligna por oncogénese insercional em células CAR-T ter sido registado até ao momento, este risco permanece. Como tal, após o tratamento,

os pacientes devem ser monitorizados ao longo da vida, quanto ao desenvolvimento de neoplasias secundárias, bem como à recorrência da doença. (43,63,64,71)

7.3.1 Farmacovigilância

A terapia CAR-T apresenta consideráveis riscos, identificados e potenciais. Embora a maioria dos efeitos adversos seja reversível, alguns podem tornar-se fatais se não forem apropriadamente controlados.

O titular da AIM do produto CAR-T deve concretizar as atividades e medidas de farmacovigilância descritas no Plano de Gestão de Risco, que é parte integrante da autorização.

A aprovação de cada produto exigiu a implementação de estratégias de avaliação e minimização de riscos. Estas vêm descritas nas informações do produto e incluem elementos para garantir o uso seguro e eficaz da terapia. Existem recomendações e precauções a seguir, nomeadamente, orientações para a gestão da SLC e das reações adversas neurológicas.

Os elementos chave para minimização de risco são a disponibilidade de tocilizumab, qualificação do centro de tratamento e preparação dos profissionais de saúde para a gestão de riscos. Como tal, os profissionais de saúde devem completar um programa educacional, assegurado pelo titular da AIM. Um programa educacional para pacientes é, igualmente, fundamental.

A aprovação das terapias CAR-T é sujeita a requisitos pós-autorização. O titular da AIM deve aumentar a base de dados existente, fornecendo dados de novos estudos que definam melhor a relação benefício-risco do seu produto – estudos de eficácia e segurança pós-autorização (PAES e PASS, respetivamente). Estudos observacionais para avaliar toxicidades a longo prazo são um exemplo. Relatórios periódicos de segurança devem também ser emitidos. Deste modo, para possibilitar estes requisitos, deve existir um registo dos doentes tratados, permitindo monitorizá-los a longo prazo. (35,55,59,63,69)

8 Desafios e perspectivas futuras

Apesar do seu sucesso, a terapia celular CAR-T ainda apresenta alguns aspectos menos positivos e desafios para enfrentar. Vários esforços têm sido feitos nesse sentido e no de otimizar cada vez mais esta imunoterapia, procurando aumentar a sua aplicabilidade.

8.1 Limitações

As limitações da terapia CAR-T são diversas, porém prendem-se sobretudo com os aspectos abaixo indicados, que continuam a representar fortes preocupações.

➤ Toxicidade

Apesar dos esforços para melhor descrever e gerir as toxicidades da terapia, garantir a sua segurança não é tarefa fácil. Isso deve-se, sobretudo, à heterogeneidade dos produtos e à condição do paciente. (76) À medida que mais produtos CAR-T e alvos são testados, os perfis de toxicidade podem diferir. Nomeadamente, os potenciais efeitos *on-target/off-tumor* podem ser menos toleráveis que a aplasia associada à terapia dirigida a células B. Consequentemente, a implementação de orientações uniformes para a gestão de toxicidades é dificultada. Além disso, os efeitos a longo prazo ainda não são totalmente conhecidos. (4,54)

➤ Resistência e recidiva

À medida que mais doentes são tratados e dados de acompanhamentos mais longos ficam disponíveis, verifica-se que remissões duráveis são alcançáveis apenas numa fração desses doentes. Após tratamento com CAR-T anti-CD19, cerca de 10-20% dos pacientes não consegue entrar em remissão e aproximadamente 30-50% dos que atingem remissão terão recaída dentro de 1 ano. Acredita-se que as principais causas de recorrência sejam a exaustão ou limitada persistência das CAR-T e a perda ou subexpressão do antígeno alvo. Como mecanismo de escape imunológico pelas células tumorais, pode haver regulação negativa ou mutação do antígeno, surgindo variantes irreconhecíveis e resistentes às CAR-T. (52,54,66,87) Deste modo, as CAR-T falham e há progressão do tumor. (36)

➤ Complexidade logística e custo

A terapia CAR-T envolve um processo altamente complexo, fortemente regulamentado e demorado. O período de espera necessário à produção do produto é uma das principais limitações da terapia. Da leucaferese à administração, a maioria dos produtos estudados exigiu

um período de 2 a 4 semanas. Este tempo de espera é especialmente crítico para pacientes com doença avançada, com risco de rápida progressão. (3,15,69,76)

O preço das terapias CAR-T tem sido motivo de debate. Nos EUA, a *Novartis* estabeleceu um custo de 475.000\$ para *Kymriah* e a *Gilead* um custo de 373.000\$ para *Yescarta* e *Tecartus*. Na Europa, os valores podem chegar aos 400.000€. Contudo, o custo total da terapia, considerando hospitalizações e gestão de complicações, aumenta significativamente, podendo atingir 1.300.000€ por paciente. (21,76,88) Os consideráveis custos associados a terapias celulares e génicas personalizadas representam uma barreira crítica à sua adoção. (33,89)

➤ **Aplicação a tumores sólidos**

Apesar do sucesso clínico obtido em cancro hematológicos, a terapia CAR-T tem apresentado resultados menos encorajadores nos cancro sólidos. (4,7,90) Infelizmente, a aplicação desta terapia a tumores sólidos, responsáveis por 80% das mortes por cancro, continua a ser um enorme desafio. (65,66) O sucesso neste campo é dificultado por vários fatores característicos dos tumores sólidos, que se tornam um obstáculo à terapia CAR-T (4,17):

Dificuldade na seleção de antígenos alvo – Os tecidos tumorais sólidos são bastante complexos, apresentando alta heterogeneidade de antígenos, onde nem todas as células expressam o mesmo antígeno. Igualmente preocupante é a escassez de TAAs restritos ao tumor/ausentes em tecidos normais. Além disso, os efeitos no alvo/extra-tumor podem ser mais problemáticos pois os TAAs potenciais em tumores sólidos são mais prováveis de serem expressos em órgãos essenciais. (17,49,52,91)

Pobre infiltração de células T no tumor – As células CAR-T têm baixa capacidade de se infiltrar e migrar nos tumores sólidos. Estes possuem uma vasculatura desregulada, com diminuída expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas, que medeiam, respetivamente, o extravasamento e o tráfego de células T nos tecidos tumorais. As células T também podem não expressar os recetores de quimiocinas apropriados. Além disso, a densa e fibrótica matriz em redor do tumor constitui uma forte barreira física. (15,30,36,91)

Hostilidade do TME – O microambiente dos tumores sólidos apresenta barreiras adicionais à função das células T. É um meio metabolicamente desfavorável e fortemente imunossupressor, caracterizado por: *stress* oxidativo, esgotamento nutricional, pH ácido e hipóxia; regulação positiva de recetores inibitórios das células T, como os de *checkpoint* imunológico; presença de células imunológicas supressoras e citocinas inibitórias. Este arsenal

de fatores hostis no TME leva à ineficácia, exaustão e prejudicada persistência das células T, favorecendo a evasão imunológica das células tumorais. (Figura 6) (7,30,36,51,65,91)

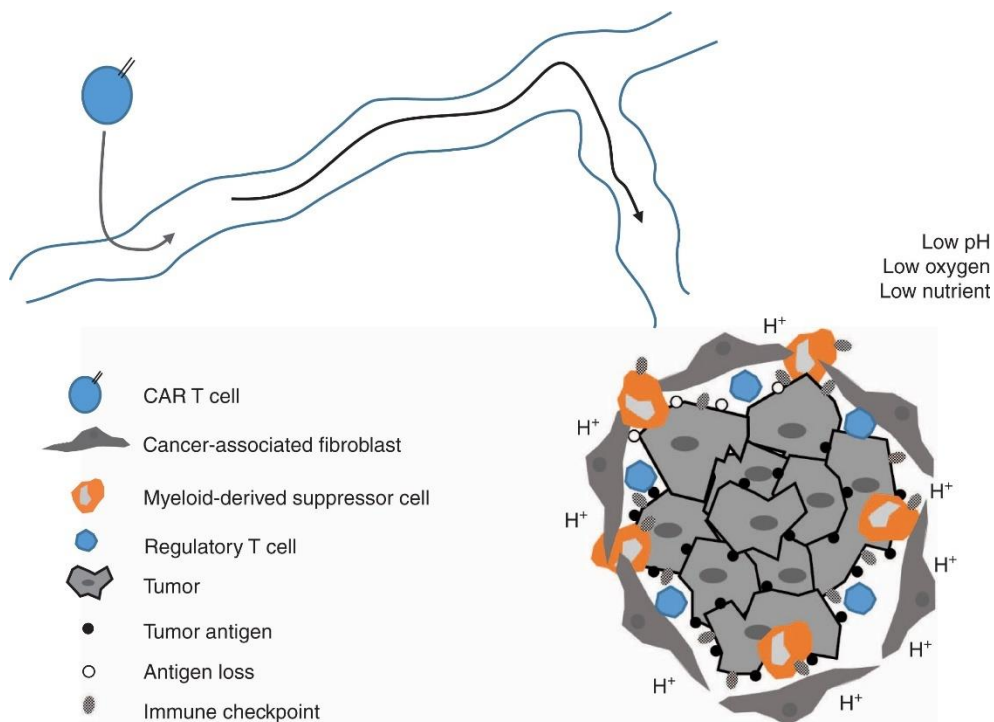


Figura 6. Múltiplos obstáculos às células CAR-T no microambiente de tumores sólidos.

Nos tumores sólidos, as CAR-T enfrentam várias barreiras que limitam a sua atividade anti-tumoral. Os fibroblastos associados ao cancro e a densa matriz extracelular criam uma barreira física em torno do tumor. Células imunossupressoras, como células supressoras derivadas da linhagem mielóide ou células T reguladoras, suprimem as funções efetoras das CAR-T. A regulação positiva de *checkpoints* imunológicos e o meio metabólico desfavorável (contendo oxigênio, nutrientes e pH diminuídos) comprometem a persistência e a eficácia das CAR-T. Retirado de (92)

8.2 Estratégias

As necessidades não atendidas e limitações da terapia constituem um foco para constante pesquisa e otimização. Com base nos fatores responsáveis pelas mesmas e na união dos princípios de imunologia com os desenvolvimentos em áreas como a biologia celular, molecular e engenharia genética, foram surgindo abordagens promissoras para contornar tais desafios e aperfeiçoar a terapia. (30,51,54)

A produção de células CAR-T autólogas constitui um processo moroso, caro e logisticamente complexo. A natureza personalizada da terapia está sujeita a um material celular inicial imprevisível e a fortes riscos em caso de falha na produção e perda de lote. (3,76)

Células CAR-T alogénicas ou universais, derivadas de dadores saudáveis, têm sido testadas e podem ultrapassar vários desafios da produção individualizada. Num único lote, seria possível produzir várias doses, criando um produto CAR-T de prateleira/*off-the-shelf*, estando “pronto para uso”, mal o paciente necessitasse. Aumentar-se-ia a disponibilidade, qualidade e padronização do produto celular, economizando tempo precioso ao doente e custos.

Uma grande aposta na tecnologia CAR-T é o uso de tecnologias de edição genética, nomeadamente o sistema CRISPR/Cas9. Estas ferramentas possibilitam inativar ou inserir especificamente certas sequências de genes, oferecendo oportunidades quase ilimitadas para mudanças e melhorias nos produtos CAR-T.

Em células alogénicas, ao suprimir a expressão de moléculas auto-identificáveis, como TCR e MHC, minimiza-se o risco de DECH e rejeição imunológica pelo paciente. (6,36,38,48,69) Expressar CARs em células alternativas às T, como células NK, também poderia minimizar este risco. (31,93)

Além de células alternativas, expressar o CAR em subpopulações definidas de células T também se encontra em estudo. (4,45)

A edição genética pode ainda vir a eliminar a necessidade de transferência genética do CAR através de vetores virais, que têm os seus próprios riscos e desafios. Este método permite integrar o CAR num *locus* específico, por exemplo no *locus* TRAC, permitindo regular e uniformizar facilmente a expressão do CAR. (21,34,36,45)

Outra estratégia em estudo para transferência do CAR é a reprogramação de células T *in vivo* através de nanopartículas, como alternativa à complexa modificação *ex vivo*. (15,49)

Como resultado do constante estudo e desenvolvimento do CAR e de elementos e atributos adicionais funcionalmente vantajosos, surge uma “*next/smart generation*” de células CAR-T multifacetadas. (Figura 7) Consoante o objetivo clínico e com o intuito de obter maior segurança e eficácia, esta nova geração pode: atingir simultaneamente vários antígenos, superando a heterogeneidade e perda de antígenos; possuir sistemas para discriminar células malignas de saudáveis; ser modificada por edição de genes para resistir à supressão do TME; ter uma ativação controlada; incluir mecanismos de segurança, através de “interruptores” ou “genes suicida”, contra falhas e toxicidades. (30,34,36,91)

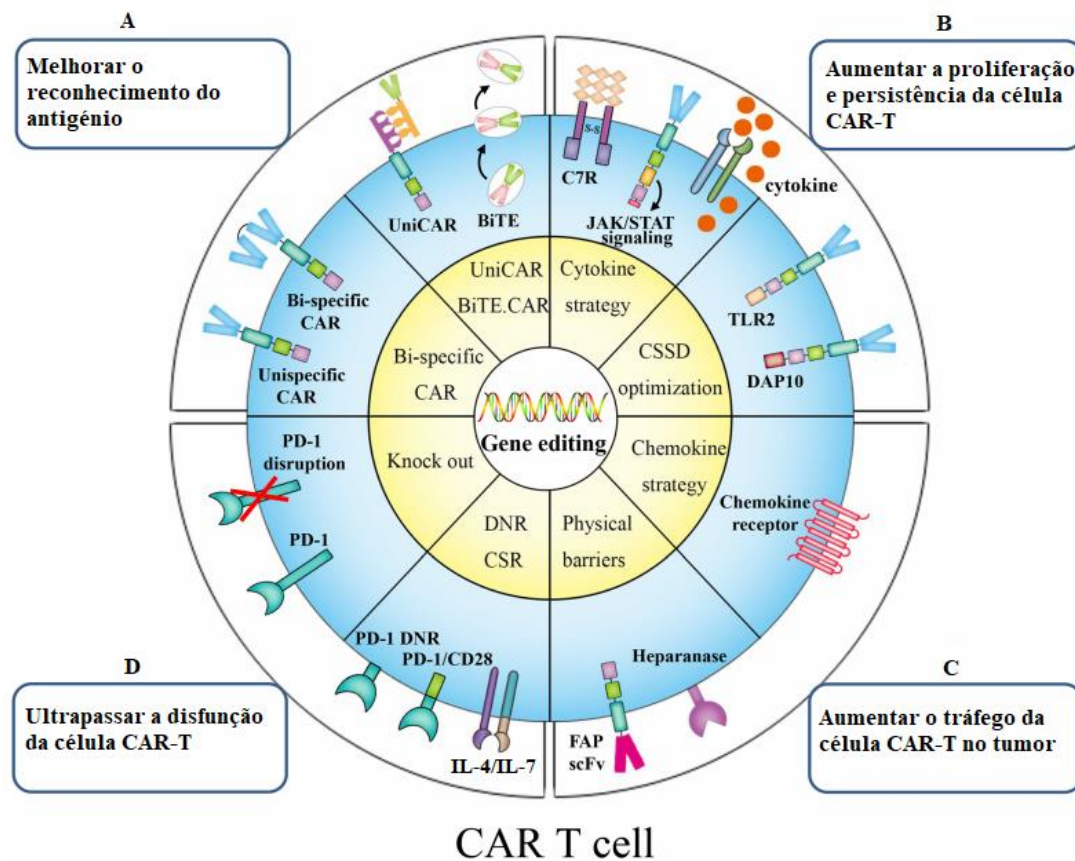


Figura 7. Algumas estratégias da próxima geração de células CAR-T.

A. Células CAR-T bi-específicas têm dois TAAs alvo diferentes, exibindo capacidade e especificidade superior no reconhecimento de antígenos; células CAR-T universais (UniCAR) utilizam adaptadores para reconhecer o antígeno, podendo atingir vários TAAs/cancros diferentes, consoante o adaptador fornecido (atividade controlada); células CAR-T secretoras de BiTE (*bispecific T-cell engager*) também permitem reconhecer vários TAAs; **B.** É possível fortalecer a ativação da célula T, reforçando vias de sinalização estimulatórias, expressão de citocinas ou otimizando domínios coestimuladores; **C.** A expressão de receptores de quimiocinas adequados pode melhorar a capacidade migratória da célula no tumor; CAR-Ts direcionadas a fibroblastos ou expressando heparanase podem destruir barreiras físicas do TME. **D.** Receptores de troca quiméricos (CSR), ao fundir exodomínios de receptores de moléculas inibitórias com endodomínios de receptores de moléculas estimulatórias, como IL-4/IL-7, transformam a sinalização negativa em positiva. Receptores sem domínios de sinalização intracelular (DNR) esgotam o ligante, permitindo diminuir sinais inibitórios; a edição de genes permite silenciar genes de moléculas inibitórias. Adaptado de (94)

A combinação de células CAR-T com outros tratamentos anti-neoplásicos, como imunoterapia (nomeadamente, inibidores de *checkpoints*), quimioterapia ou radioterapia, pode alcançar efeitos sinérgicos e melhorar resultados clínicos. (22,36,93)

8.3 Alvos em estudo

A terapia celular CAR-T tem sofrido uma grande e rápida evolução nos últimos anos. O número de ensaios clínicos com células CAR-T aumentou substancialmente, sendo que mais de 600 ensaios foram registrados em *ClinicalTrials.gov*, até ao momento. Apesar do interesse global, a maioria dos estudos desenvolvem-se na China e nos EUA.

Atualmente, diversos CARs estão em estudo, em várias fases de ensaios clínicos, para diferentes antígenos alvo e tipos de tumores. CD19, BCMA, CD22 e CD20 são dos alvos mais estudados em tumores hematológicos, como mieloma múltiplo, vários linfomas e leucemias. Muitos são os cânceros sólidos e respetivos TAAs estudados com a terapia CAR-T. (Figura 8). Contudo, os TAAs mais comuns nos ensaios com tumores sólidos são: MSLN, mucina 1, GPC3, GD2, HER2, EGFR e EGFR variante III. (6,76,95,96)

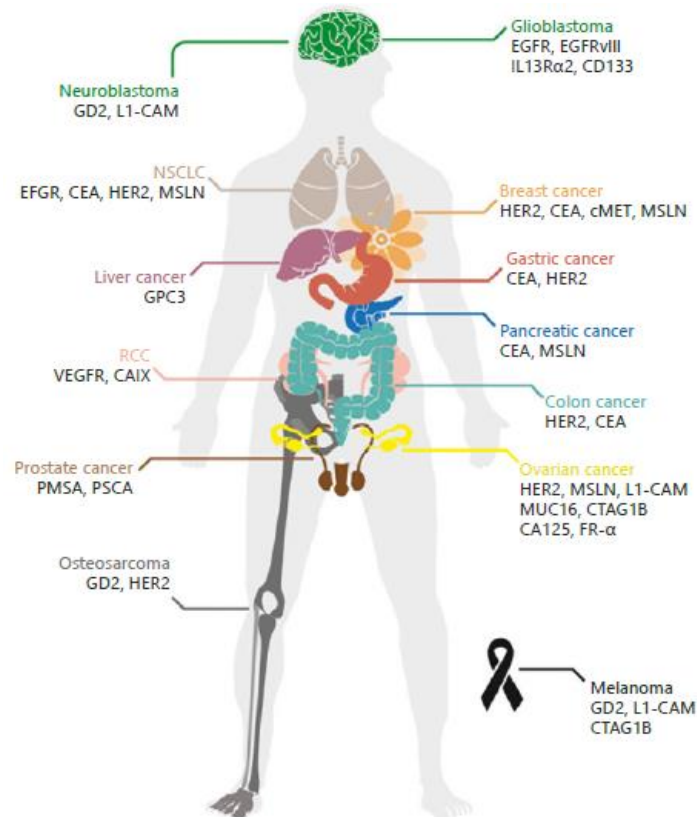


Figura 8. Principais tumores sólidos e respetivos TAAs em estudo com células CAR-T.

RCC – Renal cell carcinoma; NSCLC – Non-small cell lung cancer. Retirado de (97)

Em investigação também se encontram vias de administração das CAR-T alternativas à intravenosa, como intratumoral, intracraniana e intraperitoneal, bem como a aplicação desta terapia celular além da oncologia, nomeadamente em doenças autoimunes ou infecciosas, por exemplo, na infeção pelo VIH. (6,7,16,35,41,54)

9 Conclusões

A imunoterapia com células CAR-T teve um avanço notório na última década, fruto do árduo trabalho de investigação e de desenvolvimento na área. Consórcios entre indústria biofarmacêutica, centros médicos e de investigação académica facilitaram a transferência e aperfeiçoamento de processos, aceleraram o desenvolvimento e promoveram a aprovação desta modalidade terapêutica.

Até agora, esta terapia avançada já permitiu dar respostas a necessidades não atendidas na área da oncologia. Resultados impressionantes no tratamento de cancros hematológicos proporcionaram a aprovação pela FDA de três fármacos de células CAR-T. Estes reavivaram a esperança em muitos pacientes com doenças “intratáveis” e prognósticos bastante reservados.

Este sucesso revigorou nitidamente o campo da oncologia, demonstrando que tratamentos inovadores, sustentados por altos conhecimentos científicos e tecnológicos, podem alcançar aprovação e comercialização.

Os desafios são muitos e a tecnologia, claramente, ainda não é perfeita. Contudo, estratégias e soluções inteligentes estão em desenvolvimento para superar as limitações apresentadas pela terapia. A cooperação e o interesse crescente das empresas de biotecnologia e farmacêuticas certamente resultará numa aprimorada tecnologia, com métodos de fabrico otimizados, e num ampliado espectro de aplicações clínicas.

Aguardam-se esforços contínuos que consigam proporcionar uma terapia mais perfeita, com melhor relação benefício-risco e, eventualmente, possível de se tornar num tratamento de primeira ou segunda linha, de futuro.

Só o tempo revelará o lugar definitivo da terapia celular CAR-T na história. No entanto, parece evidente que esta já ajudou a tornar o futuro da terapia celular mais brilhante, abrindo caminho para outras terapias celulares com promessa no tratamento de um número crescente de patologias.

Referências Bibliográficas

1. MSD. Cancro Online [Internet]. [cited 2020 Oct 8]. Available from: <https://www.cancro-online.pt/cancro/informacao-basica/o-que-e-o-cancro/>
2. SNS 24. Cancro [Internet]. [cited 2020 Oct 8]. Available from: <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/cancro/#sec-0>
3. Sales M. Boletim Abril-Junho do CIM: Imunoterapia anticancerígena [Internet]. 2019 [cited 2020 Feb 24]. Available from: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/publicacoes/boletimcim_abr_jun2019_19626290345d2c835ce6a4a.pdf
4. Singh AK, McGuirk JP. CAR T cells: continuation in a revolution of immunotherapy. *Lancet Oncol.* 2020;21(3):e168–78.
5. Li Z, Song W, Rubinstein M, Liu D. Recent updates in cancer immunotherapy: A comprehensive review and perspective of the 2018 China Cancer Immunotherapy Workshop in Beijing. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):142.
6. June CH, Sadelain M. Chimeric antigen receptor therapy. *N Engl J Med.* 2018;379(1):64–73.
7. Tariq SM, Haider SA, Hasan M, Tahir A, Khan M, Rehan A, et al. Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: A Beacon of Hope in the Fight Against Cancer. *Cureus.* 2018;10(10):e3486.
8. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology.* 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2014.
9. Owen J, Punt J, Tranford S. *Kuby Immunology.* 7th ed. New York: W. H. Freeman and Comp.; 2013.
10. Roh KH. Artificial methods for T cell activation: Critical tools in T cell biology and T cell immunotherapy. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1064:207–19.
11. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(3):220–8.
12. Lee HG, Cho MZ, Choi JM. Bystander CD4+ T cells: crossroads between innate and adaptive immunity. *Exp Mol Med.* 2020;52(8):1255–63.

13. Perica K, Varela JC, Oelke M, Schneck J. Adoptive T Cell Immunotherapy For Cancer. *Rambam Maimonides Med J*. 2015;6(1):e0004.
14. Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM. Cancer immunotherapy: The beginning of the end of cancer? *BMC Med*. 2016;14:73.
15. Riley RS, June CH, Langer R, Mitchell MJ. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(3):175–96.
16. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*. 2018;359(6382):1361–5.
17. Met Ö, Jensen KM, Chamberlain CA, Donia M, Svane IM. Principles of adoptive T cell therapy in cancer. *Semin Immunopathol*. 2019;41(1):49–58.
18. Dudley CV, Baer B, Simons RM. Utilization of Chimeric Antigen Receptor T-cell Therapy in Adults. *Semin Oncol Nurs*. 2019;35(5):150930.
19. Yu S, Li A, Liu Q, Li T, Yuan X, Han X, et al. Chimeric antigen receptor T cells: a novel therapy for solid tumors. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):78.
20. FDA. FDA Briefing Document - BLA 125646 - Tisagenlecleucel [Internet]. [cited 2020 Mar 22]. Available from: <https://www.fda.gov/media/106081/download>
21. Mohanty R, Chowdhury CR, Arega S, Sen P, Ganguly P, Ganguly N. CAR T cell therapy: A new era for cancer treatment (Review). *Oncol Rep*. 2019;42(6):2183–95.
22. Ti D, Niu Y, Wu Z, Fu X, Han W. Genetic engineering of T cells with chimeric antigen receptors for hematological malignancy immunotherapy. *Sci China Life Sci*. 2018;61(11):1320–32.
23. Zhu Y, Tan Y, Ou R, Zhong Q, Zheng L, Du Y, et al. Anti-CD19 chimeric antigen receptor-modified T cells for B-cell malignancies: A systematic review of efficacy and safety in clinical trials. *Eur J Haematol*. 2016;96(4):389–96.
24. Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B, Brenner MK. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol Rev*. 2014;257(1):107–26.
25. Guedan S, Calderon H, Posey AD, Maus M V. Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors. *Mol Ther - Methods Clin Dev*. 2019;12:145–56.
26. Gill S, June CH. Going viral: Chimeric antigen receptor T-cell therapy for hematological malignancies. *Immunol Rev*. 2015;263(1):68–89.

27. Batlevi CL, Matsuki E, Brentjens RJ, Younes A. Novel immunotherapies in lymphoid malignancies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(1):25–40.
28. Roselli E, Frieling JS, Thorner K, Ramello MC, Lynch CC, Abate-Daga D. CAR-T Engineering: Optimizing Signal Transduction and Effector Mechanisms. *BioDrugs*. 2019;33(6):647–59.
29. Pfefferle A, Huntington ND. You Have Got a Fast CAR: Chimeric Antigen Receptor NK Cells in Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3):706.
30. Labanieh L, Majzner RG, Mackall CL. Programming CAR-T cells to kill cancer. *Nat Biomed Eng*. 2018;2(6):377–91.
31. Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T cells: The promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(9):566–81.
32. Chandran SS, Klebanoff CA. T cell receptor-based cancer immunotherapy: Emerging efficacy and pathways of resistance. *Immunol Rev*. 2019;290(1):127–47.
33. Panagopoulou TI, Rafiq QA. CAR-T immunotherapies: Biotechnological strategies to improve safety, efficacy and clinical outcome through CAR engineering. *Biotechnol Adv*. 2019;37(7):107411.
34. Li C, Mei H, Hu Y. Applications and explorations of CRISPR/Cas9 in CAR T-cell therapy. *Brief Funct Genomics*. 2020;19(3):175–82.
35. Hartmann J, Schübler-Lenz M, Bondanza A, Buchholz CJ. Clinical development of CAR T cells—challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol Med*. 2017;9(9):1183–97.
36. Zhang Q, Ping J, Huang Z, Zhang X, Zhou J, Wang G, et al. CAR-T Cell Therapy in Cancer: Tribulations and Road Ahead. *J Immunol Res*. 2020;2020:1924379.
37. Figueroa JA, Reidy A, Mirandola L, Trotter K, Suvorava N, Figueroa A, et al. Chimeric antigen receptor engineering: A right step in the evolution of adoptive cellular immunotherapy. *Int Rev Immunol*. 2015;34(2):154–87.
38. Strohl, Naso. Bispecific T-Cell Redirection versus Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T Cells as Approaches to Kill Cancer Cells. *Antibodies*. 2019;8(3):41.
39. Stroncek D, Panch SR, Jin P, Highfill SL. CAR T-Cell: Cell Processing Laboratory Considerations. In: *Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapies for Cancer*. Elsevier

- Inc.; 2020. p. 17–28.
40. Ivics Z. Potent CAR-T cells engineered with Sleeping Beauty transposon vectors display a central memory phenotype. *Gene Ther.* 2020.
 41. Fesnak A, O’Doherty U. Clinical development and manufacture of chimeric antigen receptor T cells and the role of leukapheresis. *Eur Oncol Haematol.* 2017;13(1):28–34.
 42. Molloy E, Conry Cantilena C, West KA. Optimizing the Apheresis Product. In: *Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapies for Cancer.* Elsevier Inc.; 2020. p. 7–16.
 43. Levine BL, Miskin J, Wonnacott K, Keir C. Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* 2017;4:92–101.
 44. Vormittag P, Gunn R, Ghorashian S, Veraitch FS. A guide to manufacturing CAR T cell therapies. *Curr Opin Biotechnol.* 2018;53:164–81.
 45. Stock S, Schmitt M, Sellner L. Optimizing manufacturing protocols of chimeric antigen receptor T cells for improved anticancer immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(24):6223.
 46. Wang X, Rivière I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol Ther - Oncolytics.* 2016;3:16015.
 47. Mizukami A, Swiech K. Platforms for Clinical-Grade CAR-T Cell Expansion. In: *Chimeric Antigen Receptor T Cells. Methods in Molecular Biology.* New York: Humana, Springer; 2020. p. 139–50.
 48. Dasyam N, George P, Weinkove R. Chimeric antigen receptor T-cell therapies: Optimising the dose. *Br J Clin Pharmacol.* 2020;86(9):1678–89.
 49. Olweus J. Manufacture of CAR-T cells in the body. *Nat Biotechnol.* 2017;35(6):520–1.
 50. Knochelmann HM, Smith AS, Dwyer CJ, Wyatt MM, Mehrotra S, Paulos CM. CAR T Cells in Solid Tumors: Blueprints for Building Effective Therapies. *Front Immunol.* 2018;9:1740.
 51. Ramachandran M, Dimberg A, Essand M. The cancer-immunity cycle as rational design for synthetic cancer drugs: Novel DC vaccines and CAR T-cells. *Semin Cancer Biol.* 2017;45:23–35.
 52. Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD. The future of cancer treatment: Immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.*

- 2016;13(5):273–90.
53. Roberts ZJ, Better M, Bot A, Roberts MR, Ribas A. Axicabtagene ciloleucel, a first-in-class CAR T cell therapy for aggressive NHL. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(8):1785–96.
 54. Shah NN, Fry TJ. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(6):372–85.
 55. EMA. Kymriah: EPAR - Public Assessment Report [Internet]. [cited 2020 Apr 28]. Available from: https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/kymriah-epar-public-assessment-report_en.pdf
 56. FDA. Summary Basis for Regulatory Action - KYMRIAHA [Internet]. [cited 2020 Apr 30]. Available from: <https://www.fda.gov/media/107962/download>
 57. Maura O’Leary. Clinical Review - KYMRIAHA - FDA [Internet]. [cited 2020 May 4]. Available from: <https://www.fda.gov/media/107973/download>
 58. Davila ML, Bouhassira DCG, Park JH, Curran KJ, Smith EL, Pegram HJ, et al. Chimeric antigen receptors for the adoptive T cell therapy of hematologic malignancies. *Int J Hematol*. 2014;99(4):361–71.
 59. EMA. Yescarta: EPAR - Public Assessment Report [Internet]. [cited 2020 May 6]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/yescarta-epar-public-assessment-report_en.pdf
 60. FDA. Summary Basis for Regulatory Action - YESCARTA [Internet]. [cited 2020 May 6]. Available from: <https://www.fda.gov/media/108788/download>
 61. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-Cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2531–44.
 62. EMA. Press release - CHMP - Kymriah and Yescarta [Internet]. [cited 2020 May 12]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/first-two-car-t-cell-medicines-recommended-approval-european-union_en.pdf
 63. EMA. Kymriah: EPAR - Product Information [Internet]. [cited 2020 Aug 20]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kymriah-epar-product-information_pt.pdf
 64. EMA. Yescarta: EPAR - Product Information [Internet]. [cited 2020 Aug 20]. Available

- from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/yescarta-epar-product-information_pt.pdf
65. Kosti P, Maher J, Arnold JN. Perspectives on chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy for solid tumors. *Front Immunol*. 2018;9:1104.
 66. Feigal EG, DeWitt ND, Cantilena C, Peck C, Stroncek D. At the end of the beginning: immunotherapies as living drugs. *Nat Immunol*. 2019;20(8):955–62.
 67. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):439–48.
 68. FDA. Summary Basis for Regulatory Action - KYMRIAHA [Internet]. [cited 2020 May 2]. Available from: <https://www.fda.gov/media/113215/download>
 69. Seimetz D, Heller K, Richter J. Approval of First CAR-Ts: Have we Solved all Hurdles for ATMPs? *Cell Med*. 2019;11:1–16.
 70. FDA. Summary Basis for Regulatory Action - TECARTUS [Internet]. [cited 2020 Aug 22]. Available from: <https://www.fda.gov/media/141093/download>
 71. Zimmerman M, Pinto H. Clinical Review Memo - TECARTUS - FDA [Internet]. [cited 2020 Aug 22]. Available from: <https://www.fda.gov/media/141165/download>
 72. NCCN. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) - B-Cell Lymphomas (version 4.2020) [Internet]. [cited 2020 Aug 23]. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/b-cell.pdf
 73. FDA. Package Insert - TECARTUS [Internet]. [cited 2020 Aug 23]. Available from: <https://www.fda.gov/media/140409/download>
 74. FDA. FDA approves brexucabtagene autoleucel for relapsed or refractory mantle cell lymphoma [Internet]. [cited 2020 Aug 21]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/fda-approves-brexucabtagene-autoleucel-relapsed-or-refractory-mantle-cell-lymphoma>
 75. Gilead. Press Release: U.S. FDA Approves Kite’s Tecartus™, the First and Only CAR T Treatment for Relapsed or Refractory Mantle Cell Lymphoma [Internet]. [cited 2020 Aug 21]. Available from: <https://www.gilead.com/news-and-press/press-room/press-releases/2020/7/us-fda-approves-kites-tecartus-the-first-and-only-car-t-treatment-for->

relapsed-or-refractory-mantle-cell-lymphoma

76. Orellana-Noia VM, Portell CA, Ballen K. When to Refer a Patient for CAR T-Cell Therapy. In: Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapies for Cancer. Elsevier Inc.; 2020. p. 1–6.
77. Perica K, Curran KJ, Park JH. Peri-CAR T-Cell Management. In: Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapies for Cancer. Elsevier Inc.; 2020. p. 29–44.
78. Mahadeo KM, Khazal SJ, Abdel-Azim H, Fitzgerald JC, Taraseviciute A, Bollard CM, et al. Management guidelines for paediatric patients receiving chimeric antigen receptor T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(1):45–63.
79. Szenes V, Curran KJ. Utilization of CAR T Cell Therapy in Pediatric Patients. *Semin Oncol Nurs*. 2019;35(5):150929.
80. Titov A, Petukhov A, Staliarova A, Motorin D, Bulatov E, Shuvalov O, et al. The biological basis and clinical symptoms of CAR-T therapy-associated toxicities. *Cell Death Dis*. 2018;9(9):897.
81. Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Rev*. 2019;34:45–55.
82. Havard R, Stephens DM. Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapies: Harnessing the Power of the Immune System to Fight Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep*. 2018;13(6):534–42.
83. Song W, Zhang M. Use of CAR-T cell therapy, PD-1 blockade, and their combination for the treatment of hematological malignancies. *Clin Immunol*. 2020;214:108382.
84. LLS. Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy [Internet]. Leukemia & Lymphoma Society®. [cited 2020 Jul 10]. Available from: <https://www.lls.org/treatment/types-of-treatment/immunotherapy/chimeric-antigen-receptor-car-t-cell-therapy>
85. Kalaitidou M, Kueberuwa G, Schütt A, Gilham DE. CAR T-cell therapy: Toxicity and the relevance of preclinical models. *Immunotherapy*. 2015;7(5):487–97.
86. Leick MB, Maus M V. Toxicities associated with immunotherapies for hematologic malignancies. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2018;31(2):158–65.
87. Tokarew N, Ogonek J, Endres S, von Bergwelt-Baildon M, Kobold S. Teaching an old

- dog new tricks: next-generation CAR T cells. *Br J Cancer*. 2019;120(1):26–37.
88. Fernández C. The FDA Approves a Second CAR-T Therapy, Cheaper than Novartis' [Internet]. [cited 2020 Sep 2]. Available from: <https://www.labiotech.eu/medical/yescarta-kymriah-car-t-therapy/>
 89. Brigand T, Prokupkova A, Muller G. CAR-T Cell Therapies: How much for survival? [Internet]. Association of European Cancer Leagues. [cited 2020 Sep 2]. Available from: https://www.europeancancerleagues.org/wp-content/uploads/2018/06/CAR-T-ECL-Article_Final_20062018.pdf
 90. Newick K, O'Brien S, Moon E, Albelda SM. CAR T Cell Therapy for Solid Tumors. *Annu Rev Med*. 2017;68:139–52.
 91. Namuduri M, Brentjens RJ. Enhancing CAR T cell efficacy: the next step toward a clinical revolution? *Expert Rev Hematol*. 2020;13(5):533–43.
 92. Newick K, Moon E, Albelda SM. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for solid tumors. *Mol Ther - Oncolytics*. 2016;3:16006.
 93. Ramakrishna S, Barsan V, Mackall C. Prospects and challenges for use of CAR T cell therapies in solid tumors. *Expert Opin Biol Ther*. 2020;20(5):503–16.
 94. Tian Y, Li Y, Shao Y, Zhang Y. Gene modification strategies for next-generation CAR T cells against solid cancers. *J Hematol Oncol*. 2020;13(1):54.
 95. Wei J, Guo Y, Wang Y, Wu Z, Bo J, Zhang B, et al. Clinical development of CAR T cell therapy in China: 2020 update. *Cell Mol Immunol*. 2020.
 96. MacKay M, Afshinnekoo E, Rub J, Hassan C, Khunte M, Baskaran N, et al. The therapeutic landscape for cells engineered with chimeric antigen receptors. *Nat Biotechnol*. 2020;38(2):233–44.
 97. Metzinger MN, Verghese C, Hamouda DM, Lenhard A, Choucair K, Senzer N, et al. Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: Reach to Solid Tumor Experience. *Oncol*. 2019;97(2):59–74.