

CAR-ТЕРАПИЯ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ: ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПОДХОДЫ К МОДУЛИРОВАНИЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ CAR-T-ЛИМФОЦИТОВ

Я. Ю. Киселева , А. М. Шишкин, А. В. Иванов, Т. М. Кулинич, В. К. Боженко

Российский научный центр рентгенодиагностики, Москва, Россия

Адоптивную иммунотерапию, использующую генно-модифицированные аутологичные Т-лимфоциты с искусственным рецептором заданной специфичности (CAR-терапию) рассматривают в качестве перспективного подхода к лечению солидных опухолей, как рецидивирующих, так и на поздних стадиях развития. При использовании этого вида терапии приходится сталкиваться с рядом проблем, таких как способность опухоли к отбору клеток со сниженной экспрессией антигенов-мишеней в ходе терапии и снижение функциональной активности CAR-T-лимфоцитов иммуносупрессивным микроокружением опухоли. В обзоре обсуждены существующие генно-инженерные подходы к модификации технологии получения CAR-T-лимфоцитов для: 1) создания универсальных искусственных рецепторов, способных в ходе иммунотерапии переключаться и атаковать различные антигены-мишени; 2) повышения функциональной активности CAR-T-лимфоцитов в условиях иммуносупрессивного микроокружения путем подавления экспрессии ингибирующих рецепторов или повышения продукции цитокинов.

Ключевые слова: CAR-терапия, солидные опухоли, химерный антигенный рецептор, CAR-T-клетки, универсальные CAR, иммуносупрессивное микроокружение

Информация о вкладе авторов: Я. Ю. Киселева — анализ литературы, написание рукописи, подготовка рисунков, редактирование; А. М. Шишкин и А. В. Иванов — анализ литературы, редактирование; Т. М. Кулинич и В. К. Боженко — редактирование.

 **Для корреспонденции:** Яна Юрьевна Киселева
ул. Профсоюзная, д. 86, г. Москва, 117997; yana.kiseleva@gmail.com

Статья получена: 03.10.2019 **Статья принята к печати:** 17.10.2019 **Опубликована онлайн:** 18.10.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.066

CAR T-CELL THERAPY OF SOLID TUMORS: PROMISING APPROACHES TO MODULATING ANTITUMOR ACTIVITY OF CAR T CELLS

Kiseleva YaYu , Shishkin AM, Ivanov AV, Kulnich TM, Bozhenko VK

Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Moscow, Russia

Adoptive immunotherapy that makes use of genetically modified autologous T cells carrying a chimeric antigen receptor (CAR) with desired specificity is a promising approach to the treatment of advanced or relapsed solid tumors. However, there are a number of challenges facing the CAR T-cell therapy, including the ability of the tumor to silence the expression of target antigens in response to the selective pressure exerted by therapy and the dampening of the functional activity of CAR T cells by the immunosuppressive tumor microenvironment. This review discusses the existing gene-engineering approaches to the modification of CAR T-cell design for 1) creating universal "switchable" synthetic receptors capable of attacking a variety of target antigens; 2) enhancing the functional activity of CAR T cells in the immunosuppressive microenvironment of the tumor by silencing the expression of inhibiting receptors or by stimulating production of cytokines.

Keywords: CAR T-cell therapy, solid tumors, chimeric antigen receptor, CAR T cells, universal CARs, immunosuppressive microenvironment

Author contribution: Kiseleva YaYu analyzed the literature, prepared the draft of the manuscript, created the figures; Shishkin AM analyzed the literature and revised the manuscript; Ivanov AV analyzed the literature and revised the manuscript; Kulnich TM revised the manuscript; Bozhenko VK revised the manuscript.

 **Correspondence should be addressed:** Yana Yu. Kiseleva
Profsoyuznaya, 86, Moscow, 117997; 89036728541 yana.kiseleva@gmail.com

Received: 03.10.2019 **Accepted:** 17.10.2019 **Published online:** 18.10.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.066

Используемые на сегодняшний день традиционные методы терапии злокачественных новообразований, такие как хирургия, радио- и химиотерапия, не отвечают требуемой эффективности лечения опухолей на поздних стадиях развития, а также рецидивирующих опухолей. Недостаточная эффективность традиционных методов лечения стимулировала появление новых направлений, значительная часть которых основана на использовании механизмов иммунного ответа [1]. Одно из таких направлений — адоптивная иммунотерапия на основе химерных Т-клеточных рецепторов. Она включает введение в организм пациента аутологичных Т-лимфоцитов, модифицированных *ex vivo* методами генной инженерии и несущих на своей поверхности искусственный рецептор заданной специфичности (chimeric antigen receptor, CAR). CAR представляет собой белок слияния и состоит из внеклеточного одноцепочечного вариабельного фрагмента иммуноглобулина scFv (single-chain Fv) и внутриклеточных сигнальных доменов Т-лимфоцитов [2]. В отличие от Т-клеточных рецепторов, которые узнают процессированные антигены в составе главного комплекса гистосовместимости, химерные Т-клеточные рецепторы нацелены на распознавание

поверхностных нативных (непроцессированных) антигенов, ассоциированных со злокачественной трансформацией клеток [3]. Несмотря на успешность CAR-терапии в лечении гемобластозов [4], ее применение для лечения солидных опухолей сталкивается с рядом проблем, одна из которых — присутствие опухолеассоциированных антигенов на поверхности клеток здоровой ткани и связанное с этим развитие нежелательных цитотоксических эффектов [5, 6]. Другая проблема состоит в том, что злокачественные опухоли гетерогенны и могут изменяться под воздействием иммунотерапии в результате селекции, которая приводит к отбору клеток со сниженной экспрессией целевых антигенов. Кроме того, попав в опухоль, CAR-T-клетки оказываются в иммуносупрессивном опухолевом микроокружении, которое создают иммуносупрессивные клетки (регуляторные Т-клетки, опухолеассоциированные макрофаги, миелоидные супрессорные клетки), повышенная экспрессия ряда иммуносупрессивных молекул (среди которых можно выделить PD-L1, PD-L2, CD80, CD86), гипоксия, некроз, недостаток питательных веществ [7].

Для решения перечисленных проблем были предложены различные генно-инженерные подходы к модификации техники получения CAR-T-клеток [7–9]. Наиболее перспективны, на наш взгляд, два из них: 1) создание универсальных CAR, способных в ходе иммунотерапии переключаться и атаковать различные таргетные антигены; 2) повышение функциональной активности CAR-T-клеток в условиях иммуносупрессивного микроокружения. Данный обзор посвящен обсуждению генно-инженерных конструкций универсальных CAR и возможности модулирования противоопухолевой активности CAR-T-клеток путем подавления экспрессии ингибирующих рецепторов и повышения продукции цитокинов.

Универсальные CAR с переключаемым адаптерным модулем

Поскольку классические (применяемые в настоящее время в клинической практике) CAR моноспецифичны, одной из важнейших проблем терапии с их применением является утрата опухоли в ходе лечения таргетных антигенов, узнаваемых CAR-T-клетками. Чтобы обойти трудоемкий и затратный процесс получения новых CAR-T-клеток другой специфичности, а также расширить число одновременно или последовательно атакуемых опухолевых антигенов-мишеней, был разработан новый модульный подход, особенностью которого является разобщение антигенраспознающего и сигнального доменов классического CAR. Антигенраспознающий адаптерный модуль представляет собой отдельную молекулу, узнаваемую эктодоменом CAR. Только при наличии трех составляющих — мишени, адаптерного модуля и эффекторной CAR-T-клетки — эта система будет работать. В результате такого разделения, во-первых, возможен контролируемый запуск CAR-T-клеток, во-вторых, их быстрое выключение в случае появления токсических побочных эффектов (например, синдром высвобождения цитокинов). И в-третьих, возможно более оперативное переключение CAR-терапии с одной мишени на другую, без необходимости привлечения генной инженерии и производства CAR-T-клеток с новой специфичностью. Такая модульная система может служить в качестве универсальной CAR-системы (UniCAR). В рамках обзора мы рассмотрим наиболее перспективные на сегодняшний день разработки универсальных CAR-систем.

Модульная CAR-система с использованием биотинсвязывающих иммунорецепторов

Этот тип UniCAR-T-клеток в качестве универсального эктодомена использует авидин или стрептавидин (рис. 1А), который связывается с биотинилированными антигенспецифичными молекулами (MAT, ScFv и другими специфичными лигандами, распознающими таргетный антиген). Первая универсальная CAR-система была основана на использовании взаимодействия биотин-авидин [10]. Ее авторы показали, что Т-клетки, несущие биотинсвязывающий иммунный рецептор (biotin-binding immunoreceptor, BBIR), использующий в качестве эктодомена димер модифицированного авидина, способны связываться с опухолевыми клетками, предварительно обработанными биотинилированными антителами, активироваться и лизировать клетки-мишени. Поскольку биотин присутствует в плазме крови человека, авторами системы было также продемонстрировано, что даже сверхфизиологические концентрации биотина не вызывают антигеннезависимой активации модифицированных CAR-T-клеток и не ингибируют их активность. Еще один подход, использующий в качестве адаптеров биотинилированные антитела, был описан в другой работе [11]. В качестве эктодомена ее авторы применили высокоаффинный мономер стрептавидина mSA2. Используя биотинилированный ритуксимаб (анти-CD20 MAT) в качестве CAR-адаптера, они показали *in vitro*, что модифицированные Т-клетки активируются и лизируют клетки-мишени дозозависимым образом. Однако вопрос о возможной иммуногенности авидина и стрептавидина остается открытым и может ограничить терапевтическое применение UniCAR-T-клеток, использующих BBIR [10, 11].

Модульная CAR-система с использованием флуоресцеина изотиоцианата

В данной системе (рис. 1Б) универсальный эктодомен CAR-T-клеток содержит вариабельный фрагмент scFv, направленный против синтетического флуорохрома флуоресцеина изотиоцианата (fluorescein isothiocyanate, FITC). FITC, широко используемый в качестве флуоресцентной метки для антител, в данном случае конъюгирован с моноклональными антителами (MAT), либо рецепторным лигандом, который взаимодействует

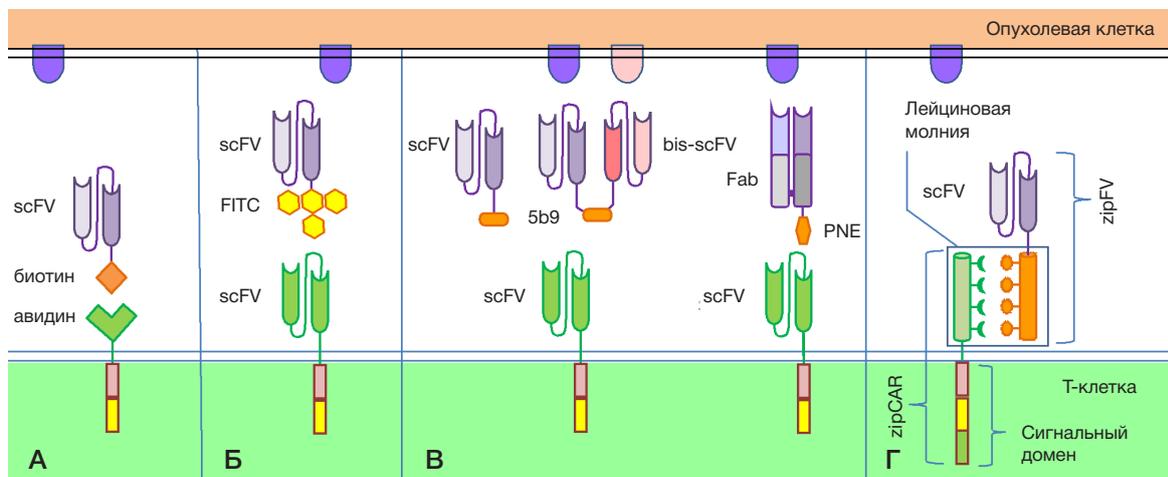


Рис. 1. Варианты универсальных CAR. **А.** Модульная CAR-система с использованием биотин-связывающих иммунорецепторов. **Б.** Модульная CAR-система с использованием флуоресцеина изотиоцианата. **В.** Модульные CAR-системы с использованием неоэпитопа (5b9, PNE). **Г.** Модульная CAR-система с использованием мотива лейциновой молнии (SUPRA CAR)

с таргетным антигеном на поверхности опухолевых клеток. В результате происходит формирование псевдоиммунологического синапса между анти-FITC-CAR-T-клеткой и опухолевой клеткой, экспрессирующей таргетный антиген. Т-клетки активируются и лизируют опухолевые клетки. В экспериментах на мышах линии NSG данная конструкция CAR-T-клеток была успешно использована против опухолей, экспрессирующих HER2 (рак молочной железы), CD20 (В-клеточная лимфома) и EGFR (рак поджелудочной железы) в сочетании с конъюгатами FITC с соответствующими mAb (trastuzumab, rituximab и cetuximab) [12]. Как и в случае с UniCAR-T-клетками, использующими BBIR, вопрос об иммуногенности FITC остается открытым [12].

Модульные CAR-системы с использованием неоэпитопа

В данной системе адапторный модуль содержит неоэпитоп, который связан с антигенспецифичным scFv или Fab, а CAR состоит из эктодомена scFv, распознающего неоэпитоп, и внутриклеточного домена. Неоэпитопы являются экзогенными пептидами, которые отсутствуют у человека. В настоящее время разработаны две модульные системы, использующие неоэпитопы 5B9 и PNE (рис. 1B).

5B9 является неиммуногенным пептидом длиной 10 аминокислотных остатков. Его последовательность представляет пептидный мотив, обнаруживаемый в ядерном аутоантигене La/SS-B, характерном для синдрома Шегрена и системной красной волчанки [13]. Первоначально разработанная 5B9-специфичная UniCAR-система [14] была направлена против антигенов CD33 и CD123 клеток острого миелобластного лейкоза. Причем авторами были сконструированы как моно-, так и биспецифичные антигенраспознающие модули, соединенные с эпитопом 5B9. Тестирование показало высокую эффективность лизиса клеток-мишеней при применении как двух независимых модулей (scFv) одновременно, так и биспецифичного модуля (bis-scFv), причем последний оказался даже более эффективным. Было установлено, что антигенраспознающие модули могут эффективно индуцировать лизис даже при очень низких концентрациях, независимо от плотности антигена на клетках-мишенях

[14]. Позднее, эффективность 5B9-специфичной UniCAR-системы была исследована в отношении солидных опухолей, с использованием клеточной и животной моделей рака простаты [15]. В данном случае неоэпитоп 5B9 был связан с scFv, направленным против PSCA (prostate stem cell antigen) — антигена стволовой клетки простаты. На мышах линии NSG с высокой и низкой опухолевыми нагрузками применение 5B9-специфичной UniCAR-системы значительно отсрочило рост опухоли и повысило выживаемость. Интересно, что проведенный авторами анализ клеток после добавления адапторного модуля к сокультивируемым опухолевым клеткам и 5B9-специфичным UniCAR-T-клеткам выявил достоверное повышение экспрессии иммуносупрессирующих молекул PD-L1 и PD-L2 на опухолевых клетках и их рецептора PD-1 на эффекторных лимфоцитах по сравнению с контролем (без добавления адаптора) [15]. Позднее та же группа авторов [16] представила данные доклинических исследований об успешном совместном применении PSCA- и PSMA-специфичных (prostate specific membrane antigen) 5B9-модулей.

Второй пептид, использованный для создания UniCAR, содержащих неоэпитоп (рис. 1B), получен из транскрипционного фактора дрожжей GCN4 и назван PNE (peptide neo-epitope). PNE содержит 14 аминокислотных остатков, отсутствует в организме человека и, как можно ожидать на основе анализа *in silico*, должен обладать низкой иммуногенностью. Разработанные в одном из исследований адапторные модули содержали PNE, связанный с Fab-фрагментом терапевтических антител, специфичных к CD19 или CD20 [17]. Универсальный эктодомен CAR содержал scFv высокоспецифичных mAb 52SR4, узнающих PNE. Используя мышиную модель ксенотрансплантата В-клеточной лейкемии, авторы показали дозозависимый контроль активности UniCAR-T-клеток и их тканевой локализации в местах скопления опухолевых клеток, а также секреции цитокинов [17]. Интересно, что применение высоких доз адапторных модулей приводило к экспансии клеток с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁻ (TEMRA, terminal effector memory expressing CD45RA⁺), в то время как при применении низких доз превалировал фенотип CD45RA⁺CD62L⁺ (central

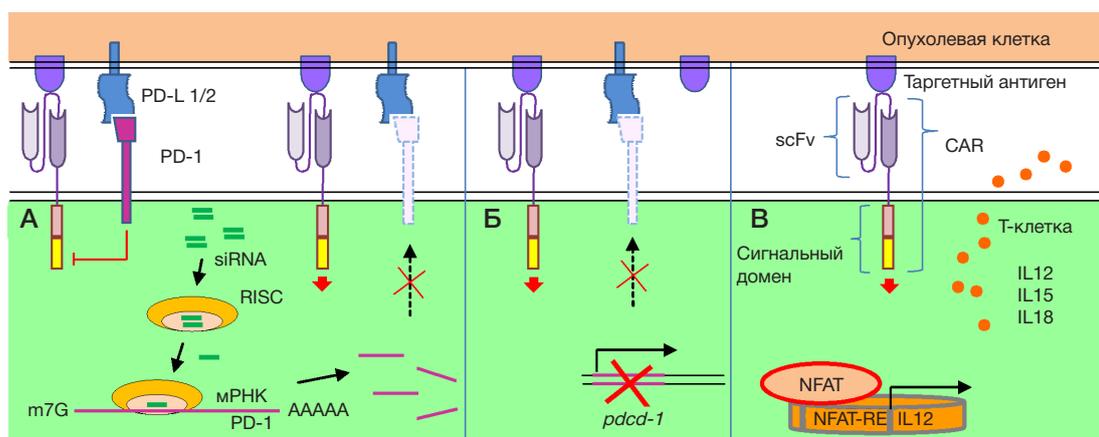


Рис. 2. Схематическая иллюстрация модуляции противоопухолевой активности CAR-T-клеток в условиях иммуносупрессивного микроокружения. **А.** Подавление экспрессии гена *pdccl-1* в Т-лимфоцитах с помощью трансфекции siRNA. Взаимодействие рецептора PD-1 со своими лигандами PD-L1/2 ингибирует активирующий сигнал CAR. После трансфекции клеток дуплексы siRNA взаимодействуют с RISC-связывающим комплексом (PHK-индуцируемый комплекс выключения гена, RNA-induced silencing complex, RISC), одна из нитей PHK удаляется из комплекса, а вторая в составе RISC связывается с mPHK, инициируя ее деградацию. В результате экспрессия рецептора PD-1 на поверхности клетки снижается. **Б.** Нокаут гена *pdccl-1* с использованием метода геномного редактирования CRISPR/Cas9. **В.** TRUCKs: помимо CAR, в Т-клетки вводят плазмиду, содержащую последовательности элементов отклика NFAT (NFAR-RE, NFAT responsive element) и последовательности генов IL12, IL15 или IL18. При взаимодействии CAR с таргетным антигеном Т-лимфоцит активируется. Это приводит к дефосфорилированию транскрипционного фактора NFAT, который перемещается в ядро и, связываясь с NFAR-RE, запускает синтез кодируемого цитокина. Локальная секреция цитокина инициирует иммунный ответ против опухолевых клеток, «невидимых» для CAR-T-лимфоцитов

memory cells). Последний, как известно, ассоциирован с пролонгированной персистенцией CAR-T-клеток и коррелирует со стойкой ремиссией у пациентов с острым лимфобластным лейкозом и хронической лимфоцитарной лейкемией [18]. Эта же группа разработала UniCAR-систему с использованием PNE, направленную против HER2-экспрессирующих клеток опухоли молочной железы [19]. В качестве антигенраспознающей части адапторного модуля использовали Fab-фрагмент mAb trastuzumab (clone 4D5). Был продемонстрирован дозозависимый цитотоксический эффект *in vitro* и полное исчезновение опухолевых очагов у мышей линии NSG, подкожно привитых клеточными линиями опухоли молочной железы с разной степенью экспрессии HER2 [19].

SUPRA CAR — модульная CAR-система с использованием мотива лейциновой молнии

Одна из наиболее перспективных разработок универсальных CAR [20] (рис. 1Г) носит название SUPRA CAR (split, universal and programmable — разделяемая, универсальная и программируемая). Эта двухкомпонентная система использует для взаимодействия своих компонентов белковый мотив лейциновой молнии (leucine zipper). Она состоит из универсального рецептора (zipCAR), экспрессируемого на поверхности Т-клеток, и противоопухолевого scFv-адаптора (zipFv). Универсальный рецептор zipCAR образован путем слияния внутриклеточных сигнальных доменов (CD28, 4-1BB и CD3z) и эктодомена, содержащего мотив лейциновой молнии. Адапторный модуль zipFv состоит из антигенспецифичного scFv и тоже содержит мотив лейциновой молнии, что обеспечивает его взаимодействие с zipCAR и последующую активацию Т-клетки. Такая конструкция, в отличие от обычных CAR со строго заданной специфичностью, позволяет выбрать в качестве мишени разные антигены без дополнительных манипуляций с иммунными клетками пациента. Уникальным свойством SUPRA CAR является также возможность настройки многих параметров, способных модулировать ответ Т-клеток и, в частности, предотвратить их чрезмерную активацию. Показано, что, варьируя такие параметры, как: 1) аффинность между мотивами лейциновой молнии, 2) аффинность между опухолевым антигеном и scFv, 3) концентрация zipFv и 4) уровень экспрессии zipCAR, можно влиять на функциональную активность Т-клеток (в частности, на продукцию интерферона гамма) [20]. В случае развития у пациента такого побочного эффекта CAR-терапии как «цитокиновый шторм», активность SUPRA-CAR-T-клеток может быть снижена или полностью подавлена добавлением конкурентного низко- или высокоаффинного адаптора zipFv. Адаптер может димеризоваться с доменом лейциновой молнии специфичного zipFv, уже введенного в организм пациента, и, таким образом, препятствовать его связыванию с zipCAR. Кроме того, с помощью данной системы можно реализовать такие логические операции, как «А или В», «А и не В». Первую используют в случае необходимости атаки CAR-T-клетками опухолевых клеток, несущих два целевых антигена и реализуют простым добавлением двух zipFv-адаптеров, специфичных для двух мишеней и связывающихся с zipCAR. Реализация второй логической операции позволяет ослабить нежелательное цитотоксическое действие против нормальных клеток, экспрессирующих опухолевый антиген. На примере двух опухолевых антигенов авторами показана принципиальная возможность сохранить живыми клетки, несущие два

таргетных антигена, один из которых опухолевый, а второй — неопухолевый [20]. Это можно реализовать путем добавления адаптера zipFv, специфичного к неопухолевому антигену, но конкурирующего с zipCAR за связывание с доменом лейциновой молнии адаптера zipFv, специфичного к опухолевому антигену. Связываясь с клеткой-мишенью, адаптеры формируют димеры, и zipFv, специфичный к опухолевому антигену, уже не может взаимодействовать с zipCAR. В результате формируется слабый цитотоксический ответ Т-клеток в отношении нормальных клеток. Было показано, что использование SUPRA-CAR-T-клеток позволяет контролировать рост опухоли в мышцах линии NSG как при внутрибрюшинном введении клеток опухоли молочной железы SK-BR-3, так и при внутривенном введении клеток линии Jurkat [20]. С целью снижения иммуногенности данной системы авторы гуманизировали лейциновые молнии, используя соответствующие последовательности факторов транскрипции человека [20].

Модулирование противоопухолевой активности CAR-T-клеток в условиях иммуносупрессивного микроокружения

Иммуносупрессивное микроокружение солидных опухолей является одним из основных факторов, препятствующих эффективной CAR-терапии. Вкупе с экспрессией ингибирующих рецепторов на поверхности CAR-T-клеток оно негативно сказывается на эффективности последних [21]. Среди ингибирующих рецепторов можно особо выделить PD-1 (рецептор программируемой клеточной гибели) и CTLA-4 (ассоциированный с цитотоксическим Т-лимфоцитом антиген 4). На сегодняшний день их рассматривают в качестве ведущих иммунных регуляторов, с помощью которых можно осуществлять контроль активации Т-клеток и поддерживать периферическую толерантность [7, 22]. CTLA-4, взаимодействуя с CD80/86, ингибирует потенциально аутореактивные Т-клетки на начальной стадии активации наивных Т-клеток, чаще всего в лимфоузлах [23], тогда как PD1, связываясь с PD-L1/2, участвует в регуляции уже ранее активированных клеток на более поздних этапах иммунного ответа, действуя прежде всего в периферических тканях [24]. Опухолевые клетки, экспрессирующие на своей поверхности соответствующие лиганды, могут использовать эти рецепторы для инaktivации опухолеспецифичных лимфоцитов, в том числе CAR-T-лимфоцитов, в результате чего приобретают устойчивость к воздействию иммунной системы [22, 25]. Следует особо отметить, что при адоптивной иммунотерапии используют активированные Т-лимфоциты. Активация Т-лимфоцитов приводит к повышению экспрессии рецепторов PD-1 и CTLA-4, что делает клетки еще более чувствительными к иммуносупрессивному эффекту опухоли [25].

Одним из подходов к блокировке нежелательного взаимодействия рецептор–лиганд является использование mAb, специфичных к рецептору или лиганду [26]. С 2011 г. в США в клинической практике для терапии метастазирующей меланомы используют ипилимумаб — mAb, блокирующие CTLA-4 [27]. Данные клинических испытаний показали также эффективность иммунотерапии ингибиторами PD-1 и PD-L1 у пациентов с меланомой [28]. Следует отметить, что комбинированное использование препаратов анти-PD-1 (ниволумаб) и анти-CTLA-4 (ипилимумаб) у пациентов с меланомой, не получавших ранее лечение, повышало выживаемость без прогрессирования заболевания и частоту объективного ответа, по сравнению с монотерапией

[29]. К настоящему времени зарегистрирован целый ряд анти-мАТ (ниволумаб, пембролизумаб, атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб), применяющихся при меланоме, немелкоклеточном раке легкого, раке мочевого пузыря и других нозологиях [27]. Однако использование данных препаратов привело к появлению целого класса новых побочных эффектов — иммуноопосредованных побочных эффектов (immune-related adverse events), к которым относят иммунный тиреодит, гепатит, колит, миокардит и ряд других [30]. Очевидно, что иммуноопосредованные побочные эффекты обусловлены неспецифической активацией иммунокомпетентных клеток, что серьезно ограничивает возможности применения этих препаратов [30].

Альтернативным подходом к модификации функциональной активности CAR-T-лимфоцитов является снижение экспрессии на Т-лимфоцитах ингибирующих рецепторов с помощью генетической модификации клеток *ex vivo* в дополнение к введению антиген-специфичного CAR-рецептора. Это может быть сделано либо с помощью трансфекции siRNA (small interfering RNA) в Т-клетки (рис. 2А) одновременно с введением ДНК- или РНК-конструкции, кодирующей антиген-специфичный рецептор [22], либо используя методы геномного редактирования с помощью CRISPR/Cas9 [31] (рис. 2Б). Так, было показано, что экспрессию мРНК CTLA-4 можно успешно подавить с помощью siRNA-технологии в лимфоцитах периферической крови больных хроническим гепатитом В [32]. Следует, однако, отметить, что специфичных CAR-рецепторов в клетки при этом не вводили. Недавно было показано, что трансфекция Т-клеток мРНК, кодирующей CAR-рецептор второго поколения, специфичный к антигену CSPG4 меланомы, и двумя siRNA, ингибирующими PD-1 и CTLA-4, приводила к снижению уровня поверхностного PD-1 и внутриклеточного CTLA-4 Т-лимфоцитов [25]. Авторы наблюдали статистически достоверное увеличение цитотоксического эффекта модифицированных Т-лимфоцитов в сравнении с контролем в отношении модельной клеточной линии меланомы (трансфицированной плазмидами, кодирующими PD-L1 и CD80) [25]. Метод геномного редактирования с использованием технологии CRISPR/Cas9 также был недавно применен для подавления экспрессии PD-1 и CTLA-4 [31, 33]. Технологию CRISPR/Cas9 можно успешно использовать для инактивации гена, кодирующего PD-1, в CAR-T-лимфоцитах, что проявлялось в значительном усилении их противоопухолевой активности *in vitro* и *in vivo* [33]. Было показано, что три гена (включая PD-1) [31] и четыре гена (включая PD-1 и CTLA-4) [34] могут быть одновременно инактивированы в CAR-T-лимфоцитах с помощью технологии CRISPR/Cas9.

Другим подходом к преодолению иммуносупрессивности опухолевого микроокружения, а также для атаки опухолевых клеток, утративших таргетный антиген на своей поверхности, является придание CAR-T-лимфоцитам способности к повышенной продукции цитокинов непосредственно в тканях-мишенях (при их активации через взаимодействие CAR с клетками-мишенями). Такие модифицированные цитокин-продуцирующие CAR-T-клетки, получившие название «TRUCK» (T cells redirected for universal cytokine killing) [35] (рис. 2В), показали высокую эффективность при доставке цитокинов в опухолевое микроокружение. В доклинических исследованиях на мышинных моделях при адоптивном переносе опухолеспецифичных клеток, секретирующих IL12, показано, что накопление его в ткани опухоли улучшает Т-клеточную цитолитическую активность [36] и способствует привлечению и активации клеток

врожденного иммунитета [37]. Показано также, что секреция IL12 локально влияет на миелоидные супрессорные клетки, дисфункциональные дендритные клетки, альтернативно активированные макрофаги и перепрограммирует их в функционально активные антигенпрезентирующие клетки, способные представлять опухолеассоциированные антигены Т-клеткам, инфильтрирующим опухоль, или TIL (tumor-infiltrating lymphocytes), что приводит к регрессии больших опухолевых очагов [38]. Клинические испытания по введению пациентам с метастатической меланомой аутологичных TIL, экспрессирующих IL12 под контролем NFAT-регуляторных элементов (nuclear factor of activated T-cells, ядерный фактор активированных Т-клеток), показали объективный клинический эффект у 10 из 16 пациентов при более низкой дозе клеток по сравнению со стандартным протоколом [39]. Однако у многих из пациентов наблюдали серьезные побочные эффекты (тяжелую гепатотоксичность, гемодинамическую нестабильность), вследствие чего испытания были остановлены [39]. Выраженная цитотоксичность TCR-T-клеток с NFAT-регулируемой экспрессией IL12 выявлена *in vivo* в экспериментах на мышинной модели [40]. Положительного результата (отсутствия токсичности *in vivo*) удалось добиться другим авторам [41], поставившим экспрессию IL12 под контроль TET-On-промотора, чувствительного к доксициклину. Временной экспрессии IL12 было достаточно, чтобы ингибировать рост меланомы B16F10, не вызывая системной цитотоксичности.

Наряду с IL12 исследовали влияние повышенной секреции интерлейкинов IL15 и IL18 на противоопухолевую активность CAR-T- и TCR-T-лимфоцитов. Показано, что продукция IL15 способствует выживанию и пролиферации модифицированных *ex vivo* CAR-T-клеток, специфичных к таким мишеням, как CD19 (при лейкемии/лимфоме) [42] и IL13R α 2 (при глиобластоме) [43]. В экспериментах на мышинной модели меланомы введение модифицированных TCR-T-клеток с NFAT-регулируемой экспрессией IL18 показало их безопасность (отсутствовали какие-либо побочные токсические эффекты), а также привело к повышению числа CD8-клеток в опухолевом очаге и усилению противоопухолевой активности [40]. Показано, что CD4-CAR-T-клетки, секретирующие IL18, активируют CD8-T-клетки, которые пролиферируют и усиливают противоопухолевый ответ у мышей с меланомой B16F10 [44]. Кроме того показано, что CAR-T-клетки, секретирующие IL18, индуцируют в опухоли острую фазу иммунного ответа по Th1-типу, что приводит к повышению выживаемости мышей с опухолями поджелудочной железы и легких [45].

ВЫВОДЫ

На сегодняшний день CAR-терапию успешно применяют в клинической практике для лечения гематологических онкозаболеваний. Однако простая экстраполяция опыта использования CAR в терапии гемобластозов на солидные опухоли невозможна в связи с вероятностью возникновения неприемлемых побочных эффектов из-за токсичности CAR-T-лимфоцитов в отношении нормальных клеток, а также ослаблением функциональной активности CAR-T-клеток в условиях иммуносупрессивного микроокружения солидных опухолей. В настоящее время наметились пути решения этих проблем, такие как создание универсальных CAR, способных быстро переключаться и атаковать различные таргетные антигены, и придание CAR-T-клеткам

устойчивости к иммуносупрессивному влиянию путем их дальнейшей модификации генно-инженерными методами. Интенсивные исследования, проводимые в этих двух направлениях, показывают обнадеживающие результаты,

что позволяет надеяться на появление арсенала CAR-T-клеток, способного обеспечить эффективную и безопасную для пациентов клеточную терапию солидных злокачественных новообразований.

Литература

- Palucka AK, Coussens LM. The Basis of Oncoimmunology. *Cell*. 2016; 164 (6): 1233–47. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.049. PubMed PMID: 26967289; PubMed Central PMCID: PMC4788788.
- Jena B, Dotti G, Cooper LJ. Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood*. 2010; 116 (7): 1035–44. DOI: 10.1182/blood-2010-01-043737. PubMed PMID: 20439624; PubMed Central PMCID: PMC2938125.
- Klebanoff CA, Rosenberg SA, Restifo NP. Prospects for gene-engineered T cell immunotherapy for solid cancers. *Nature medicine*. 2016; 22 (1): 26–36. DOI: 10.1038/nm.4015. PubMed PMID: 26735408; PubMed Central PMCID: PMC6295670.
- Park JH, Geyer MB, Brentjens RJ. CD19-targeted CAR T-cell therapeutics for hematologic malignancies: interpreting clinical outcomes to date. *Blood*. 2016; 127 (26): 3312–20. DOI: 10.1182/blood-2016-02-629063. PubMed PMID: 27207800; PubMed Central PMCID: PMC4929923.
- Liu B, Yan L, Zhou M. Target selection of CAR T cell therapy in accordance with the TME for solid tumors. *American journal of cancer research*. 2019; 9 (2): 228–41. PubMed PMID: 30906625; PubMed Central PMCID: PMC6405971.
- Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Molecular therapy oncolytics*. 2016; (3): 16011. DOI: 10.1038/mto.2016.11. PubMed PMID: 27626062; PubMed Central PMCID: PMC5008265.
- Tahmasebi S, Elahi R, Esmailzadeh A. Solid Tumors Challenges and New Insights of CAR T Cell Engineering. *Stem cell reviews and reports*. 2019; 15 (5): 619–36. DOI: 10.1007/s12015-019-09901-7. PubMed PMID: 31161552.
- Minutolo NG, Hollander EE, Powell DJ, Jr. The Emergence of Universal Immune Receptor T Cell Therapy for Cancer. *Frontiers in oncology*. 2019; (9): 176. DOI: 10.3389/fonc.2019.00176. PubMed PMID: 30984613; PubMed Central PMCID: PMC6448045.
- Stoiber S, Cadilha BL, Benmebarek MR, Lesch S, Endres S, Kobold S. Limitations in the Design of Chimeric Antigen Receptors for Cancer Therapy. *Cells*. 2019; 8 (5). DOI: 10.3390/cells8050472. PubMed PMID: 31108883; PubMed Central PMCID: PMC6562702.
- Urbanska K, Lanitis E, Poussin M, Lynn RC, Gavin BP, Kelderman S, et al. A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. *Cancer research*. 2012; 72 (7): 1844–52. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3890. PubMed PMID: 22315351; PubMed Central PMCID: PMC3319867.
- Lohmueller JJ, Ham JD, Kvorjak M, Finn OJ. mSA2 affinity-enhanced biotin-binding CAR T cells for universal tumor targeting. *Oncoimmunology*. 2017; 7 (1): e1368604. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1368604. PubMed PMID: 29296519; PubMed Central PMCID: PMC5739565.
- Tamada K, Geng D, Sakoda Y, Bansal N, Srivastava R, Li Z, et al. Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012; 18 (23): 6436–45. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1449. PubMed PMID: 23032741.
- Koristka S, Cartellieri M, Arndt C, Bippes CC, Feldmann A, Michalk I, et al. Retargeting of regulatory T cells to surface-inducible autoantigen La/SS-B. *Journal of autoimmunity*. 2013; (42): 105–16. DOI: 10.1016/j.jaut.2013.01.002. PubMed PMID: 23352111.
- Cartellieri M, Feldmann A, Koristka S, Arndt C, Loff S, Ehninger A, et al. Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts. *Blood cancer journal*. 2016; 6 (8): e458. DOI: 10.1038/bcj.2016.61. PubMed PMID: 27518241; PubMed Central PMCID: PMC5022178 directed to CD33, La and the UniCAR platform technology. AE, SL and MC are employed by GEMoAb and CPT, respectively. The other authors declare no conflict of interest.
- Pishali Bejestani E, Cartellieri M, Bergmann R, Ehninger A, Loff S, Kramer M, et al. Characterization of a switchable chimeric antigen receptor platform in a pre-clinical solid tumor model. *Oncoimmunology*. 2017; 6 (10): e1342909. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1342909. PubMed PMID: 29123951; PubMed Central PMCID: PMC5665068.
- Feldmann A, Arndt C, Bergmann R, Loff S, Cartellieri M, Bachmann D, et al. Retargeting of T lymphocytes to PSCA- or PSMA positive prostate cancer cells using the novel modular chimeric antigen receptor platform technology "UniCAR". *Oncotarget*. 2017; 8 (19): 31368–85. DOI: 10.18632/oncotarget.15572. PubMed PMID: 28404896; PubMed Central PMCID: PMC5458214.
- Rodgers DT, Mazagova M, Hampton EN, Cao Y, Ramadoss NS, Hardy IR, et al. Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016; 113 (4): E459–68. DOI: 10.1073/pnas.1524155113. PubMed PMID: 26759369; PubMed Central PMCID: PMC4743815.
- Riddell SR, Sommermeyer D, Berger C, Liu LS, Balakrishnan A, Salter A, et al. Adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells of defined subset composition. *Cancer journal*. 2014; 20 (2): 141–4. DOI: 10.1097/PPO.000000000000036. PubMed PMID: 24667960; PubMed Central PMCID: PMC4149222.
- Cao Y, Rodgers DT, Du J, Ahmad I, Hampton EN, Ma JS, et al. Design of Switchable Chimeric Antigen Receptor T Cells Targeting Breast Cancer. *Angewandte Chemie*. 2016; 55 (26): 7520–4. DOI: 10.1002/anie.201601902. PubMed PMID: 27145250; PubMed Central PMCID: PMC5207029.
- Cho JH, Collins JJ, Wong WW. Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses. *Cell*. 2018; 173 (6): 1426–38. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.038. PubMed PMID: 29706540; PubMed Central PMCID: PMC5984158.
- Scarfo I, Maus MV. Current approaches to increase CAR T cell potency in solid tumors: targeting the tumor microenvironment. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2017; (5): 28. DOI: 10.1186/s40425-017-0230-9. PubMed PMID: 28331617; PubMed Central PMCID: PMC5359946.
- Sioud M. Releasing the Immune System Brakes Using siRNAs Enhances Cancer Immunotherapy. *Cancers*. 2019; 11 (2). DOI: 10.3390/cancers11020176. PubMed PMID: 30717461.
- Boutros C, Tarhini A, Routier E, Lambotte O, Ladurie FL, Carbonnel F, et al. Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nature reviews Clinical oncology*. 2016; 13 (8): 473–86. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.58. PubMed PMID: 27141885.
- Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell*. 2016; 165 (1): 35–44. DOI: 10.1016/j.cell.2016.02.065. PubMed PMID: 26997480; PubMed Central PMCID: PMC4808437.
- Simon B, Harrer DC, Schuler-Thurner B, Schaft N, Schuler G, Dorrie J, et al. The siRNA-mediated downregulation of PD-1 alone or simultaneously with CTLA-4 shows enhanced in vitro CAR-T-cell functionality for further clinical development towards the potential use in immunotherapy of melanoma. *Experimental dermatology*. 2018; 27 (7): 769–78. DOI: 10.1111/exd.13678. PubMed PMID: 29704887.
- Martinez M, Moon EK. CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in immunology*. 2019; (10): 128. DOI:

- 10.3389/fimmu.2019.00128. PubMed PMID: 30804938; PubMed Central PMCID: PMC6370640.
27. Vivot A, Jacot J, Zeitoun JD, Ravaud P, Crequit P, Porcher R. Clinical benefit, price and approval characteristics of FDA-approved new drugs for treating advanced solid cancer, 2000–2015. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017; 28 (5): 1111–6. DOI: 10.1093/annonc/mdx053. PubMed PMID: 28453694.
 28. Medina PJ, Adams VR. PD-1 Pathway Inhibitors: Immunology Agents for Restoring Antitumor Immune Responses. *Pharmacotherapy*. 2016; 36 (3): 317–34. DOI: 10.1002/phar.1714. PubMed PMID: 26822752; PubMed Central PMCID: PMC5071694.
 29. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2015; 373 (1): 23–34. DOI: 10.1056/NEJMoa1504030. PubMed PMID: 26027431; PubMed Central PMCID: PMC5698905.
 30. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *The New England journal of medicine*. 2018; 378 (2): 158–68. DOI: 10.1056/NEJMra1703481. PubMed PMID: 29320654.
 31. Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2017; 23 (9): 2255–66. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1300. PubMed PMID: 27815355; PubMed Central PMCID: PMC5413401.
 32. Yu Y, Wu H, Tang Z, Zang G. CTLA4 silencing with siRNA promotes deviation of Th1/Th2 in chronic hepatitis B patients. *Cellular & molecular immunology*. 2009; 6 (2): 123–7. DOI: 10.1038/cmi.2009.17. PubMed PMID: 19403062; PubMed Central PMCID: PMC4002649.
 33. Rupp LJ, Schumann K, Roybal KT, Gate RE, Ye CJ, Lim WA, et al. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Scientific reports*. 2017; 7 (1): 737. DOI: 10.1038/s41598-017-00462-8. PubMed PMID: 28389661; PubMed Central PMCID: PMC5428439.
 34. Ren J, Zhang X, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget*. 2017; 8 (10): 17002–11. DOI: 10.18632/oncotarget.15218. PubMed PMID: 28199983; PubMed Central PMCID: PMC5370017.
 35. Knochelmann HM, Smith AS, Dwyer CJ, Wyatt MM, Mehrotra S, Paulos CM. CAR T Cells in Solid Tumors: Blueprints for Building Effective Therapies. *Frontiers in immunology*. 2018; (9): 1740. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01740. PubMed PMID: 30140266; PubMed Central PMCID: PMC6094980.
 36. Kerkar SP, Muranski P, Kaiser A, Boni A, Sanchez-Perez L, Yu Z, et al. Tumor-specific CD8+ T cells expressing interleukin-12 eradicate established cancers in lymphodepleted hosts. *Cancer research*. 2010; 70 (17): 6725–34. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0735. PubMed PMID: 20647327; PubMed Central PMCID: PMC2935308.
 37. Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, Imperato GH, Tedder TF, Sadelain M, et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood*. 2012; 119 (18): 4133–41. DOI: 10.1182/blood-2011-12-400044. PubMed PMID: 22354001; PubMed Central PMCID: PMC3359735.
 38. Kerkar SP, Goldszmid RS, Muranski P, Chinnasamy D, Yu Z, Reger RN, et al. IL12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors. *The Journal of clinical investigation*. 2011; 121 (12): 4746–57. DOI: 10.1172/JCI58814. PubMed PMID: 22056381; PubMed Central PMCID: PMC3226001.
 39. Zhang L, Morgan RA, Beane JD, Zheng Z, Dudley ME, Kassim SH, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015; 21 (10): 2278–88. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2085. PubMed PMID: 25695689; PubMed Central PMCID: PMC4433819.
 40. Kunert A, Chmielewski M, Wijers R, Berrevoets C, Abken H, Debets R. Intra-tumoral production of IL18, but not IL12, by TCR-engineered T cells is non-toxic and counteracts immune evasion of solid tumors. *Oncoimmunology*. 2017; 7 (1): e1378842. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1378842. PubMed PMID: 29296541; PubMed Central PMCID: PMC5739571.
 41. Alsaieedi A, Holler A, Velica P, Bendle G, Stauss HJ. Safety and efficacy of Tet-regulated IL12 expression in cancer-specific T cells. *Oncoimmunology*. 2019; 8 (3): 1542917. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1542917. PubMed PMID: 30723575; PubMed Central PMCID: PMC6350686.
 42. Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C, Mahendravada A, Zhang M, Vera J, et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia*. 2010; 24 (6): 1160–70. DOI: 10.1038/leu.2010.75. PubMed PMID: 20428207; PubMed Central PMCID: PMC2888148.
 43. Krenciute G, Prinzing BL, Yi Z, Wu MF, Liu H, Dotti G, et al. Transgenic Expression of IL15 Improves Antiglioma Activity of IL13Ralpha2-CAR T Cells but Results in Antigen Loss Variants. *Cancer immunology research*. 2017; 5 (7): 571–81. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0376. PubMed PMID: 28550091; PubMed Central PMCID: PMC5746871.
 44. Hu B, Ren J, Luo Y, Keith B, Young RM, Scholler J, et al. Augmentation of Antitumor Immunity by Human and Mouse CAR T Cells Secreting IL18. *Cell reports*. 2017; 20 (13): 3025–33. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.09.002. PubMed PMID: 28954221; PubMed Central PMCID: PMC6002762.
 45. Chmielewski M, Abken H. CAR T Cells Releasing IL18 Convert to T-Bet(high) FoxO1(low) Effectors that Exhibit Augmented Activity against Advanced Solid Tumors. *Cell reports*. 2017; 21 (11): 3205–19. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.11.063. PubMed PMID: 29241547.

References

1. Palucka AK, Coussens LM. The Basis of Oncoimmunology. *Cell*. 2016; 164 (6): 1233–47. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.049. PubMed PMID: 26967289; PubMed Central PMCID: PMC4788788.
2. Jena B, Dotti G, Cooper LJ. Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood*. 2010; 116 (7): 1035–44. DOI: 10.1182/blood-2010-01-043737. PubMed PMID: 20439624; PubMed Central PMCID: PMC2938125.
3. Klebanoff CA, Rosenberg SA, Restifo NP. Prospects for gene-engineered T cell immunotherapy for solid cancers. *Nature medicine*. 2016; 22 (1): 26–36. DOI: 10.1038/nm.4015. PubMed PMID: 26735408; PubMed Central PMCID: PMC6295670.
4. Park JH, Geyer MB, Brentjens RJ. CD19-targeted CAR T-cell therapeutics for hematologic malignancies: interpreting clinical outcomes to date. *Blood*. 2016; 127 (26): 3312–20. DOI: 10.1182/blood-2016-02-629063. PubMed PMID: 27207800; PubMed Central PMCID: PMC4929923.
5. Liu B, Yan L, Zhou M. Target selection of CAR T cell therapy in accordance with the TME for solid tumors. *American journal of cancer research*. 2019; 9 (2): 228–41. PubMed PMID: 30906625; PubMed Central PMCID: PMC6405971.
6. Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Molecular therapy oncolytics*. 2016; (3): 16011. DOI: 10.1038/mto.2016.11. PubMed PMID: 27626062; PubMed Central PMCID: PMC5008265.
7. Tahmasebi S, Elahi R, Esmaeilzadeh A. Solid Tumors Challenges and New Insights of CAR T Cell Engineering. *Stem cell reviews and reports*. 2019; 15 (5): 619–36. DOI: 10.1007/s12015-019-09901-7. PubMed PMID: 31161552.

8. Minutolo NG, Hollander EE, Powell DJ, Jr. The Emergence of Universal Immune Receptor T Cell Therapy for Cancer. *Frontiers in oncology*. 2019; (9): 176. DOI: 10.3389/fonc.2019.00176. PubMed PMID: 30984613; PubMed Central PMCID: PMC6448045.
9. Stoiber S, Cadilha BL, Benmebarek MR, Lesch S, Endres S, Kobold S. Limitations in the Design of Chimeric Antigen Receptors for Cancer Therapy. *Cells*. 2019; 8 (5). DOI: 10.3390/cells8050472. PubMed PMID: 31108883; PubMed Central PMCID: PMC6562702.
10. Urbanska K, Lanitis E, Poussin M, Lynn RC, Gavin BP, Kelderman S, et al. A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. *Cancer research*. 2012; 72 (7): 1844–52. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3890. PubMed PMID: 22315351; PubMed Central PMCID: PMC3319867.
11. Lohmueller JJ, Ham JD, Kvorjak M, Finn OJ. mSA2 affinity-enhanced biotin-binding CAR T cells for universal tumor targeting. *Oncoimmunology*. 2017; 7 (1): e1368604. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1368604. PubMed PMID: 29296519; PubMed Central PMCID: PMC5739565.
12. Tamada K, Geng D, Sakoda Y, Bansal N, Srivastava R, Li Z, et al. Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012; 18 (23): 6436–45. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1449. PubMed PMID: 23032741.
13. Koristka S, Cartellieri M, Arndt C, Bippes CC, Feldmann A, Michalk I, et al. Retargeting of regulatory T cells to surface-inducible autoantigen La/SS-B. *Journal of autoimmunity*. 2013; (42): 105–16. DOI: 10.1016/j.jaut.2013.01.002. PubMed PMID: 23352111.
14. Cartellieri M, Feldmann A, Koristka S, Arndt C, Loff S, Ehninger A, et al. Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts. *Blood cancer journal*. 2016; 6 (8): e458. DOI: 10.1038/bcj.2016.61. PubMed PMID: 27518241; PubMed Central PMCID: PMC5022178 directed to CD33, La and the UniCAR platform technology. AE, SL and MC are employed by GEMoaB and CPT, respectively. The other authors declare no conflict of interest.
15. Pishali Bejestani E, Cartellieri M, Bergmann R, Ehninger A, Loff S, Kramer M, et al. Characterization of a switchable chimeric antigen receptor platform in a pre-clinical solid tumor model. *Oncoimmunology*. 2017; 6 (10): e1342909. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1342909. PubMed PMID: 29123951; PubMed Central PMCID: PMC5665068.
16. Feldmann A, Arndt C, Bergmann R, Loff S, Cartellieri M, Bachmann D, et al. Retargeting of T lymphocytes to PSCA- or PSMA positive prostate cancer cells using the novel modular chimeric antigen receptor platform technology "UniCAR". *Oncotarget*. 2017; 8 (19): 31368–85. DOI: 10.18632/oncotarget.15572. PubMed PMID: 28404896; PubMed Central PMCID: PMC5458214.
17. Rodgers DT, Mazagova M, Hampton EN, Cao Y, Ramadoss NS, Hardy IR, et al. Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016; 113 (4): E459–68. DOI: 10.1073/pnas.1524155113. PubMed PMID: 26759369; PubMed Central PMCID: PMC4743815.
18. Riddell SR, Sommermeyer D, Berger C, Liu LS, Balakrishnan A, Salter A, et al. Adoptive therapy with chimeric antigen receptor-modified T cells of defined subset composition. *Cancer journal*. 2014; 20 (2): 141–4. DOI: 10.1097/PPO.000000000000036. PubMed PMID: 24667960; PubMed Central PMCID: PMC4149222.
19. Cao Y, Rodgers DT, Du J, Ahmad I, Hampton EN, Ma JS, et al. Design of Switchable Chimeric Antigen Receptor T Cells Targeting Breast Cancer. *Angewandte Chemie*. 2016; 55 (26): 7520–4. DOI: 10.1002/anie.201601902. PubMed PMID: 27145250; PubMed Central PMCID: PMC5207029.
20. Cho JH, Collins JJ, Wong WW. Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses. *Cell*. 2018; 173 (6): 1426–38. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.038. PubMed PMID: 29706540; PubMed Central PMCID: PMC5984158.
21. Scarfo I, Maus MV. Current approaches to increase CAR T cell potency in solid tumors: targeting the tumor microenvironment. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2017; (5): 28. DOI: 10.1186/s40425-017-0230-9. PubMed PMID: 28331617; PubMed Central PMCID: PMC5359946.
22. Sioud M. Releasing the Immune System Brakes Using siRNAs Enhances Cancer Immunotherapy. *Cancers*. 2019; 11 (2). DOI: 10.3390/cancers11020176. PubMed PMID: 30717461.
23. Boutros C, Tarhini A, Routier E, Lambotte O, Ladurie FL, Carbonnel F, et al. Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nature reviews Clinical oncology*. 2016; 13 (8): 473–86. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.58. PubMed PMID: 27141885.
24. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskova S, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell*. 2016; 165 (1): 35–44. DOI: 10.1016/j.cell.2016.02.065. PubMed PMID: 26997480; PubMed Central PMCID: PMC4808437.
25. Simon B, Harrer DC, Schuler-Thurner B, Schaft N, Schuler G, Dorrie J, et al. The siRNA-mediated downregulation of PD-1 alone or simultaneously with CTLA-4 shows enhanced in vitro CAR-T-cell functionality for further clinical development towards the potential use in immunotherapy of melanoma. *Experimental dermatology*. 2018; 27 (7): 769–78. DOI: 10.1111/exd.13678. PubMed PMID: 29704887.
26. Martinez M, Moon EK. CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in immunology*. 2019; (10): 128. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00128. PubMed PMID: 30804938; PubMed Central PMCID: PMC6370640.
27. Vivot A, Jacot J, Zeitoun JD, Ravaud P, Crequit P, Porcher R. Clinical benefit, price and approval characteristics of FDA-approved new drugs for treating advanced solid cancer, 2000–2015. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017; 28 (5): 1111–6. DOI: 10.1093/annonc/mdx053. PubMed PMID: 28453694.
28. Medina PJ, Adams VR. PD-1 Pathway Inhibitors: Immunology Agents for Restoring Antitumor Immune Responses. *Pharmacotherapy*. 2016; 36 (3): 317–34. DOI: 10.1002/pha.1714. PubMed PMID: 26822752; PubMed Central PMCID: PMC5071694.
29. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2015; 373 (1): 23–34. DOI: 10.1056/NEJMoa1504030. PubMed PMID: 26027431; PubMed Central PMCID: PMC5698905.
30. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *The New England journal of medicine*. 2018; 378 (2): 158–68. DOI: 10.1056/NEJMra1703481. PubMed PMID: 29320654.
31. Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2017; 23 (9): 2255–66. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1300. PubMed PMID: 27815355; PubMed Central PMCID: PMC5413401.
32. Yu Y, Wu H, Tang Z, Zang G. CTLA4 silencing with siRNA promotes deviation of Th1/Th2 in chronic hepatitis B patients. *Cellular & molecular immunology*. 2009; 6 (2): 123–7. DOI: 10.1038/cmi.2009.17. PubMed PMID: 19403062; PubMed Central PMCID: PMC4002649.
33. Rupp LJ, Schumann K, Roybal KT, Gate RE, Ye CJ, Lim WA, et al. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Scientific reports*. 2017; 7 (1): 737. DOI: 10.1038/s41598-017-00462-8. PubMed PMID: 28389661; PubMed Central PMCID: PMC5428439.
34. Ren J, Zhang X, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget*. 2017; 8 (10): 17002–11. DOI: 10.18632/oncotarget.15218. PubMed PMID: 28199983; PubMed Central PMCID: PMC5370017.
35. Knochelmann HM, Smith AS, Dwyer CJ, Wyatt MM, Mehrotra S, Paulos CM. CAR T Cells in Solid Tumors: Blueprints for Building Effective Therapies. *Frontiers in immunology*. 2018; (9): 1740. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01740. PubMed PMID: 30140266; PubMed Central PMCID: PMC6094980.

36. Kerkar SP, Muranski P, Kaiser A, Boni A, Sanchez-Perez L, Yu Z, et al. Tumor-specific CD8+ T cells expressing interleukin-12 eradicate established cancers in lymphodepleted hosts. *Cancer research*. 2010; 70 (17): 6725–34. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0735. PubMed PMID: 20647327; PubMed Central PMCID: PMC2935308.
37. Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, Imperato GH, Tedder TF, Sadelain M, et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood*. 2012; 119 (18): 4133–41. DOI: 10.1182/blood-2011-12-400044. PubMed PMID: 22354001; PubMed Central PMCID: PMC3359735.
38. Kerkar SP, Goldszmid RS, Muranski P, Chinnasamy D, Yu Z, Reger RN, et al. IL12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors. *The Journal of clinical investigation*. 2011; 121 (12): 4746–57. DOI: 10.1172/JCI58814. PubMed PMID: 22056381; PubMed Central PMCID: PMC3226001.
39. Zhang L, Morgan RA, Beane JD, Zheng Z, Dudley ME, Kassim SH, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015; 21 (10): 2278–88. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2085. PubMed PMID: 25695689; PubMed Central PMCID: PMC4433819.
40. Kunert A, Chmielewski M, Wijers R, Berrevoets C, Abken H, Debets R. Intra-tumoral production of IL18, but not IL12, by TCR-engineered T cells is non-toxic and counteracts immune evasion of solid tumors. *Oncoimmunology*. 2017; 7 (1): e1378842. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1378842. PubMed PMID: 29296541; PubMed Central PMCID: PMC5739571.
41. Alsaieedi A, Holler A, Velica P, Bendle G, Stauss HJ. Safety and efficacy of Tet-regulated IL12 expression in cancer-specific T cells. *Oncoimmunology*. 2019; 8 (3): 1542917. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1542917. PubMed PMID: 30723575; PubMed Central PMCID: PMC6350686.
42. Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C, Mahendravada A, Zhang M, Vera J, et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia*. 2010; 24 (6): 1160–70. DOI: 10.1038/leu.2010.75. PubMed PMID: 20428207; PubMed Central PMCID: PMC2888148.
43. Krenciute G, Prinzing BL, Yi Z, Wu MF, Liu H, Dotti G, et al. Transgenic Expression of IL15 Improves Antiglioma Activity of IL13Ralpha2-CAR T Cells but Results in Antigen Loss Variants. *Cancer immunology research*. 2017; 5 (7): 571–81. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0376. PubMed PMID: 28550091; PubMed Central PMCID: PMC5746871.
44. Hu B, Ren J, Luo Y, Keith B, Young RM, Scholler J, et al. Augmentation of Antitumor Immunity by Human and Mouse CAR T Cells Secreting IL18. *Cell reports*. 2017; 20 (13): 3025–33. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.09.002. PubMed PMID: 28954221; PubMed Central PMCID: PMC6002762.
45. Chmielewski M, Abken H. CAR T Cells Releasing IL18 Convert to T-Bet(high) FoxO1(low) Effectors that Exhibit Augmented Activity against Advanced Solid Tumors. *Cell reports*. 2017; 21 (11): 3205–19. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.11.063. PubMed PMID: 29241547.