

# Адоптивная иммунотерапия генетически модифицированными Т-лимфоцитами, экспрессирующими химерные антигенные рецепторы

А.А. Павлова<sup>1,2</sup>, М.А. Масчан<sup>3</sup>, В.Б. Пономарев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Сколковский институт науки и технологий, инновационный центр «Сколково»; Россия, 143026 Москва, ул. Нобеля, 3;

<sup>2</sup>Мемориальный онкологический центр Слоун Кеттеринг; США, 10065 Нью-Йорк, Йорк-авеню 1275;

<sup>3</sup>Лаборатория клеточного гемостаза и тромбоза ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1

**Контакты:** Владимир Борисович Пономарев [ponomarev@mskcc.org](mailto:ponomarev@mskcc.org)

Значительная смертность от онкологических заболеваний в целом и онкогематологических в частности побуждает научно-медицинское сообщество к разработке новых методов лечения. Одним из новейших методов является адоптивная клеточная терапия с использованием генетически-модифицированных Т-лимфоцитов больного, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы (CAR) к специфическим опухолевым антигенам. Несмотря на высокую стоимость и наличие осложнений в применении, многообещающие клинические испытания у больных даже на поздних стадиях онкозаболеваний позволяют рассчитывать на успешное внедрение этого метода в практику.

В статье представлен обзор основных принципов данной технологии, опубликованных результатов клинических испытаний CAR Т-клеток с акцентом на таргетирование антигена CD19, осложнений данной терапии, механизмов резистентности опухолей к действию CAR Т-клеток и потенциальных путей ее преодоления.

**Ключевые слова:** онкогематологические заболевания, адоптивная терапия, модифицированные Т-клетки, химерный антигенный рецептор

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-1-17-32

## Adoptive immunotherapy with genetically engineered T lymphocytes modified to express chimeric antigen receptors

A.A. Pavlova<sup>1,2</sup>, M.A. Maschan<sup>3</sup>, V.B. Ponomarev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo Innovation Center; 3 Nobel St., Moscow 143026, Russia;

<sup>2</sup>Memorial Sloan Kettering Cancer Center; 1275 York Avenue, New York, NY 10065, USA;

<sup>3</sup>National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela Str., Moscow 117997, Russia

Significant mortality due to oncological diseases as a whole, and oncohematological diseases in particular, motivates scientific and medical community to develop new treatment methods. One of the newest methods is adoptive cell therapy using patient's own T-cells modified to express chimeric antigen receptors (CAR) to tumor-specific antigens. Despite high cost and side effects of treatment, promising clinical trials even in patients with advanced disease allow to anticipate successful use of this method in clinical practice.

The article includes a review of the main principles of this technique, published results of clinical studies of CAR T-cells with a focus on CD19 gene targeting, complications of this therapy, mechanisms of tumor resistance to CAR T-cells, and potential ways to overcome it.

**Key words:** oncohematological diseases, adoptive therapy, modified T-cells, chimeric antigen receptor

### Вступление

Несмотря на успехи в диагностике и терапии, онкологические заболевания занимают 2-е место в структуре смертности (15,5 %) после болезней системы кровообращения [1]. При диссеминированных опухолях эффективность стандартных программ лечения, включая хирургию, лучевую терапию и химиотерапию, остается минимальной.

Одним из наиболее перспективных направлений в современной онкологии является иммунотерапия, которая на данный момент включает такие подходы, как ингибиторы контрольных путей (checkpoint inhibitors), нативные и конъюгированные с химиопрепаратами

или радиоактивными частицами антитела, противоопухолевые вакцины и адоптивную клеточную терапию. Адоптивная терапия генно-модифицированными Т-лимфоцитами стала, безусловно, прорывным направлением в лечении ряда гематологических опухолей. В ее основе лежит создание пула опухоль-специфичных цитотоксических лимфоцитов путем внесения *ex vivo* трансгена, кодирующего химерный антигенный рецептор (chimeric antigen receptor, CAR). Такие клетки получили в англоязычной литературе название CAR Т-клетки.

После длительного периода разработок и тестирования *in vitro* и на лабораторных животных данная технология была разрешена к клиническим испытаниям

ниям в ряде стран Европы, Азии и Северной Америки. Наиболее впечатляющие результаты были получены при применении CAR T-клеток у больных с В-клеточными лимфомами, хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) и особенно у больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ).

Из экспериментальной технологии лечение онкологических заболеваний CAR T-клетками превращается в быстро развивающийся подход к терапии с более чем 100 зарегистрированными клиническими исследованиями при гематологических новообразованиях и солидных опухолях.

В этой обзорной статье мы обсудим основные принципы данной технологии и опубликованные результаты клинических испытаний CAR T-клеток, с акцентом на таргетирование антигена CD19. Мы также кратко остановимся на осложнениях данной терапии, механизмах резистентности опухолей к действию CAR T-клеток и потенциальных путях ее преодоления.

### История

В первых работах, посвященных CAR [2–4], Т-клеточные тельца (T-bodies) — как их изначально назвали — создавались для фундаментальных исследований механизмов активации Т-лимфоцитов. Эта модель была использована для разьяснения физико-химических параметров, обуславливающих сигнал от Т-клеточного рецептора (ТКР), и изучения роли

молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) и дополнительных (костимуляторных) рецепторов.

Известно, что обычные Т-лимфоциты распознают белковые антигены в виде коротких пептидов, представленных в комплексе с молекулой ГКГ на поверхности клеток. Благодаря сложному механизму процессинга и презентации антигена Т-лимфоциты способны распознавать внутриклеточные антигены. В отличие от ТКР, антитела распознают антигенные эпитопы нативных молекул белка на поверхности раковых клеток. Взаимодействие антиген — антитело не требует процессинга и презентации антигена, не зависит от ГКГ, однако в физиологических условиях взаимодействие антител с клеточными антигенами ограничено молекулами, экспрессированными на наружной мембране клеток. ТКР и иммуноглобулины относятся к суперсемейству иммуноглобулинов и демонстрируют существенную гомологию молекулярной структуры. Альфа-субъединица ТКР гомологична легкой, а бета-субъединица — тяжелой вариabельным цепям иммуноглобулинов, за исключением отсутствующего в ТКР Fc фрагмента (от англ. fragment crystallizable — кристаллизующийся фрагмент). Более того, гены  $\alpha$ -цепи ТКР проходят тот же тип рекомбинации (VJ), что и гены легких цепей иммуноглобулинов, гены  $\beta$ -цепи проходят VDJ-рекомбинацию, так же как и гены тяжелых цепей иммуноглобулинов [4] (рис. 1).

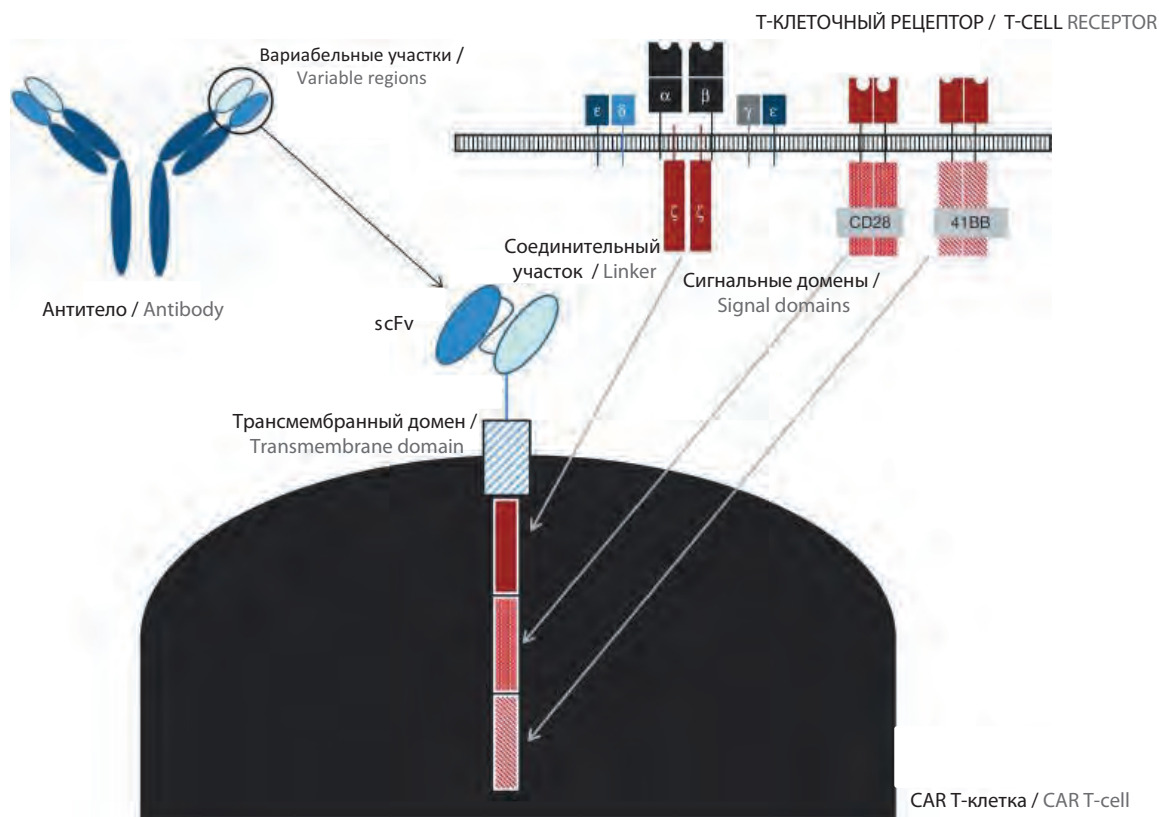


Рис. 1. Основные компоненты химерных антигенных рецепторов различных поколений (адаптировано из [5])

Fig. 1. Main components of chimeric antigen receptors of different generations (adapted from [5])

Внутриклеточный участок ТКР короткий и не несет сигнальных последовательностей, необходимых для передачи внутриклеточного сигнала. Активирующий сигнал от ТКР передается через комплекс молекул CD3, в частности через сигнальные последовательности  $\zeta$ -цепи CD3. Взаимодействие ТКР с антигенным пептидом в комплексе с ГКГ запускает передачу сигнала, функциональные последствия которого определяются физиологическим или экспериментальным контекстом. В частности, в условиях классической антиген-презентации при развитии иммунного ответа во время инфекции активирующий сигнал запускает пролиферацию, дифференцировку и созревание эффекторных функций Т-лимфоцитов [4].

Сходство в строении ТКР и иммуноглобулина и организации соответствующих геномных регионов стало основой для попытки совместить антиген-связывающую вариабельную часть антител с константной частью ТКР в одном полипептиде. Целью такой «молекулярной хирургии» является придание ТКР способности распознавать антигены независимо от ГКГ и сохранять внутриклеточные сигнальные пути и функционал Т-лимфоцитов. Успех такой манипуляции позволяет объединить гигантский репертуар специфичностей и возможностей инжиниринга моноклональных антител с эффекторным разнообразием Т-лимфоцитов. Химерные рецепторы 1-го поколения представляют собой молекулы, в которых внеклеточная антиген-распознающая часть получена из моноклонального антитела с известной специфичностью, а внутриклеточная часть представлена нативным ТКР или химерной молекулой, включающей фрагмент  $\zeta$ -цепи CD3 (см. рис. 1).

Цитотоксическая активность первых CAR изучалась с использованием гибридных конструкций [6]. С этой целью были созданы Т-клетки, экспрессирующие рецепторы, специфичные к простат-специфическому мембранному антигену (prostate-specific membrane antigen, PSMA). Коинкубация клеточной линии рака простаты (LnCAP), экспрессирующей на своей поверхности PSMA со специфичными к нему CAR Т-клеток, показала, что активированные лимфоциты проходили 2–3 деления, после чего подвергались апоптозу [7].

Эти результаты подтвердились позже при первых клинических испытаниях CAR Т-клеток в группе пациентов с метастатическим раком яичников, метастатическим раком почки, лимфомой, нейробластомой, где были использованы химерные рецепторы 1-го поколения и отмечены низкая эффективность терапии, отсутствие значимой пролиферации и быстрая гибель терапевтических клеток [8, 9].

К середине 1990-х годов был расшифрован механизм активации Т-лимфоцитов в процессе физиологического иммунного ответа. Было установлено, что для полноценной активации, дифференцировки и пролиферации Т-клетками необходимы наличие

специфического взаимодействия комплекса антиген/молекула ГКГ с ТКР (сигнал 1) и взаимодействие костимулирующих рецепторов (CD28, 4-1BB, OX-40) на поверхности Т-клеток с соответствующими лигандами (CD80/86, 4-1BBL, OX-40L) на антигенпрезентирующих клетках (сигнал 2).

Взаимодействие CD28 с лигандом CD80/CD86 на поверхности антиген-презентирующих клеток предотвращает индуцированную активацией гибель Т-лимфоцитов и обеспечивает клональную экспансию и функциональное созревание активированных Т-лимфоцитов [10, 11]. Стало очевидным, что отсутствие лигандов костимуляторных рецепторов на поверхности опухолевых клеток предотвращает полноценную активацию CAR Т-клеток, несмотря на специфичное распознавание антигена на поверхности клетки-мишени.

Именно использование CAR, дополненных костимулирующим доменом — рецепторов 2-го поколения — стало настоящим прорывом в адоптивной клеточной терапии и выявило гигантский потенциал этой терапии [12].

### Химерный антигенный рецептор

Сегодня CAR — это рекомбинантный рецептор, обеспечивающий как специфичность взаимодействия, так и активацию Т-лимфоцитов. CAR распознает мишень с помощью внеклеточного домена — одноцепочечного вариабельного фрагмента антитела (single-chain variable fragment, scFv), отвечающего за специфичность узнавания антигена. Активацию Т-клеток, пролиферацию и созревание эффекторных функций обеспечивает внутриклеточный сигнальный домен, состоящий из  $\zeta$ -цепи CD3 и дополнительных сигнальных доменов, заимствованных у костимуляторных рецепторов, — как правило, CD28 или 4-1BB (CD137) (рис. 2).

Химерные рецепторы, содержащие один костимуляторный домен, принято считать конструкциями 2-го поколения, именно такие модификации рецепторов

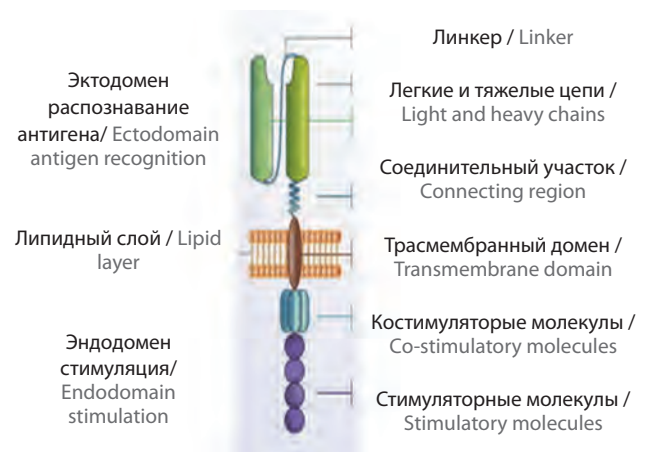


Рис. 2. Строение химерного антигенного рецептора (адаптировано из [13])

Fig. 2. Chimeric antigen receptor anatomy (adapted from [13])



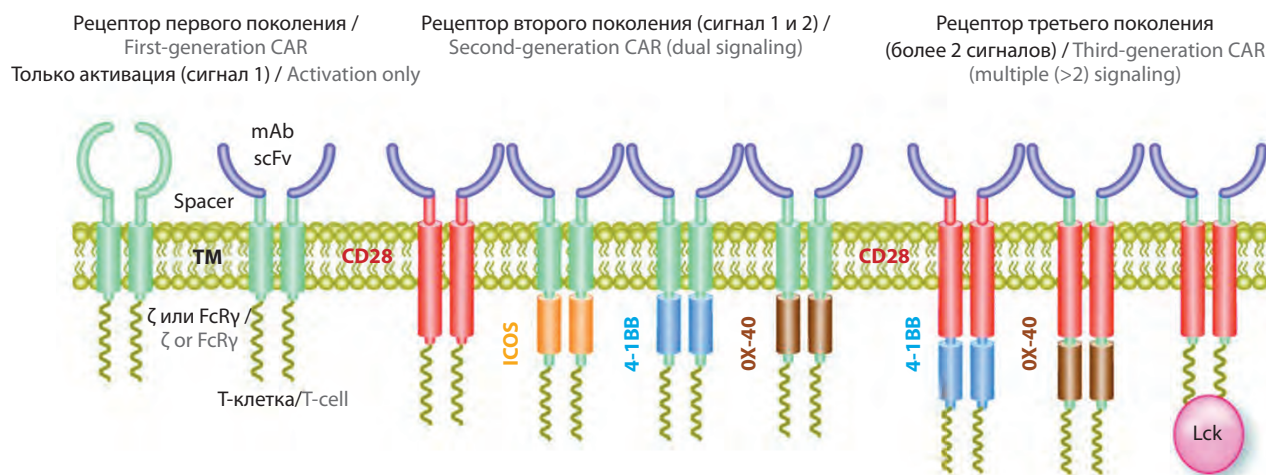


Рис. 3. Поколения химерных антигенных рецепторов (адаптировано из [18])  
Fig. 3. Generations of chimeric antigen receptors (adapted from [18])

находятся в настоящее время на этапе клинических испытаний 2–3 фазы. В конструкциях 3-го поколения была предпринята попытка улучшить функциональные свойства молекул с помощью включения 2-го костимуляторного домена, однако убедительных данных о преимуществе таких вариантов не получено [14–17] (рис. 3).

#### Требования к Т-клеткам и выбор мишени для CAR

После демонстрации принципиальной возможности управления специфичностью Т-лимфоцитов с помощью антиген-распознающих фрагментов моноклональных антител и обеспечения их высокой функциональной активности за счет синтетических внутриклеточных сигнальных доменов ключевым вопросом на пути разработки медицинского применения CAR Т-клеток стал выбор антигена. Основным механистическим требованием к мишеням для CAR Т-клеток, в сравнении с физиологическими Т-лимфоцитами, является экспрессия белка или иного антигена на поверхности опухолевой клетки. Теоретически потенциальные опухолевые антигены можно разделить на несколько групп:

- 1) антигены, содержащие новую белковую последовательность, которая появилась в результате соматической мутации и экспрессирована только опухолевыми клетками, так называемые неоантигены;
- 2) антигены, специфичные для определенной ткани/линии клеточной дифференцировки;
- 3) раково-эмбриональные антигены и антигены иммунопривилегированных тканей;
- 4) антигены, экспрессия которых на опухолевых клетках выше, чем на нормальных тканях.

Идеальная мишень — новая белковая последовательность, характерная исключительно для опухолевой линии. Одним из примеров являются мутированные варианты эпидермального фактора роста (EGFvIII) и MUC-1 [17, 19, 20]. Эмбриональные антигены и антигены иммунопривилегированных

тканей, такие как члены семейства MAGE или NY-ESO-1, активно исследуются в качестве мишеней для искусственных ТКР, однако большинство этих антигенов находится в цитоплазме и недоступно для взаимодействия с CAR [21–23]. Гиперэкспрессированные антигены в качестве мишени также широко используются для разработки новых химерных рецепторов, однако высокая эффективность Т-лимфоцитов оказывает повреждающий эффект и на здоровые ткани (так называемый on-target/off-tumor эффект), что может вести к тяжелым проявлениям токсичности, вплоть до летальных исходов. Возможность использования таких мишеней в будущем будет определяться разработкой механизмов дополнительного контроля за «включением» либо «выключением» активности CAR Т-клеток [24].

Наиболее исследованным антигеном-мишенью на сегодняшний день является CD19, представляющий собой линейно-специфичный тканевой антиген, экспрессированный практически на всех этапах дифференцировки В-лимфоцитов, за исключением плазматических клеток. CD19 экспрессируется на поверхности опухолевых клеток почти всех В-линейных опухолей (ОЛЛ, ХЛЛ, В-клеточные неходжкинские лимфомы) [25, 26]. Именно с использованием CD19-CAR Т-клеток были получены первые успешные результаты терапии, что позволило перевести технологию в клинические исследования II–III фаз.

Благодаря работе нескольких ведущих академических медицинских центров в течение нескольких лет были выработаны основные протоколы производства и клинического применения генно-модифицированных Т-клеток, экспрессирующих CAR к CD19, определено оптимальное количество клеток и оптимальный дизайн CAR для НХЛ и ХЛЛ [11, 12, 14, 27, 28]. Наиболее успешными на сегодняшний день являются результаты терапии ОЛЛ. В опубликованных работах вероятность достижения полной ремиссии для этого заболевания достигает 67–90 % [15–17, 19, 20],

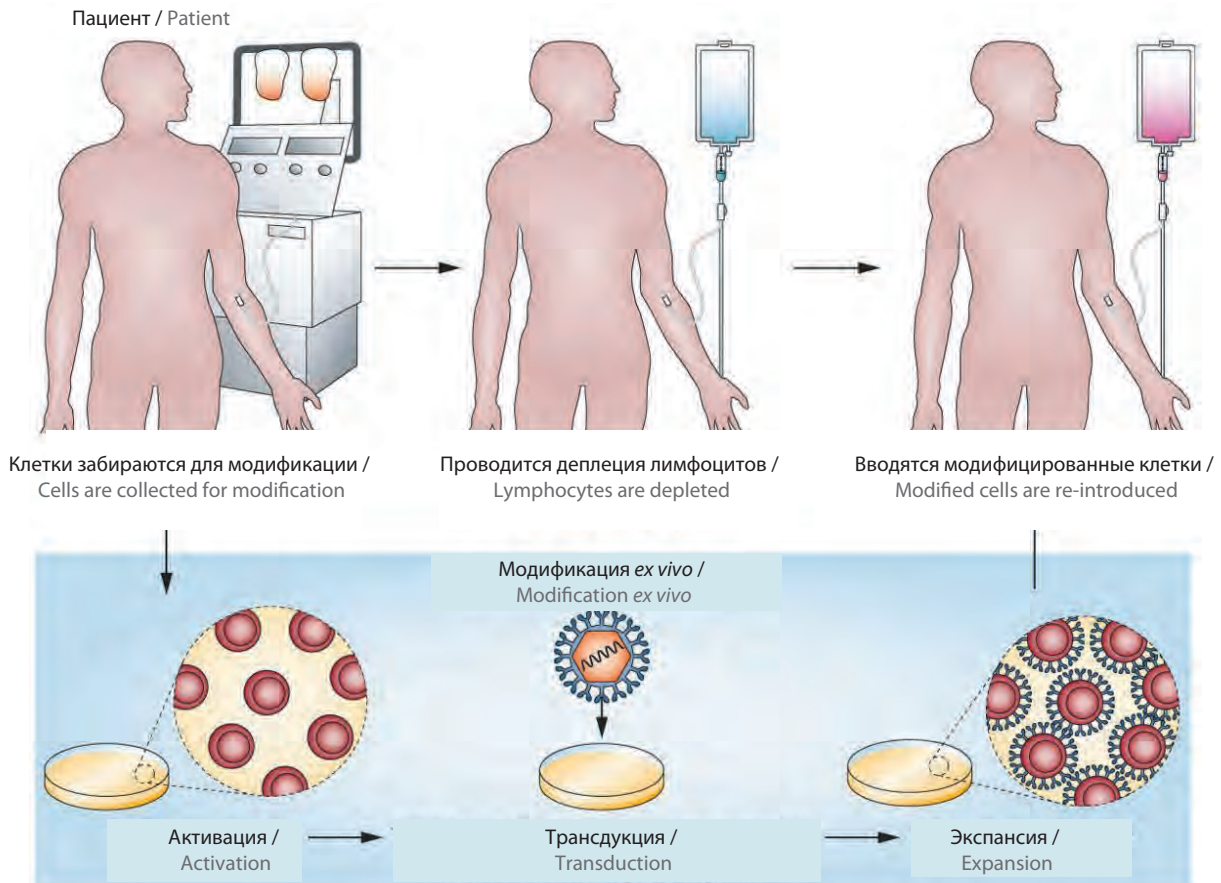


Рис. 4. Технология производства модифицированных Т-клеток (адаптировано из [30])  
 Fig. 4. Technology of producing modified T-cells (adapted from [30])

что существенно превышает опубликованные результаты терапии биспецифическими моноклональными антителами [29].

#### Технология производства

Производство CAR Т-клеток для клинического применения состоит из нескольких этапов:

- 1) афереза лейкоцитов пациента;
- 2) активации Т-лимфоцитов с помощью синтетического поликлонального активатора, связывающегося с рецепторами CD3 и CD28;
- 3) доставки трансгена;
- 4) экспансии в среде, обогащенной цитокинами;
- 5) контроля качества клеточного препарата;
- 6) криоконсервации и/или подготовки к введению [13] (рис. 4).

Первым этапом, как и для большинства видов клеточной терапии, является аферез лейкоцитов периферической крови пациента. Ключевым параметром, необходимым для производства терапевтического клеточного продукта, служит сбор достаточного количества Т-лимфоцитов, ориентировочно около  $100 \times 10^6$  клеток. В связи с этим, с точки зрения практического применения, аферез целесообразно выполнить до проведения курсов химиотерапии

с включением нуклеозидных аналогов и иных лимфодеплетирующих препаратов. В ряде протоколов перед этапом стимуляции выполняют выделение отдельных субпопуляций лимфоцитов методом иммуномагнитной селекции и/или деплецию моноцитов путем адгезии или элютиации. Продукт афереза может быть подвержен криозаморозке или незамедлительно использован для создания Т-клеток, экспрессирующих CAR. Заморозка продукта дает большую мобильность для планирования терапии, однако сопровождается снижением количества клеток в результате процедуры [31].

Вторым этапом производства является активация Т-лимфоцитов. Активация необходима для последующей экспансии клеток и эффективной трансдукции ретро- и лентивирусными векторами. Наиболее часто используется активация с использованием специального реагента — анти-CD3/CD28-антител, иммобилизованных на магнитном носителе разного размера в присутствии интерлейкина 2 или других цитокинов [32, 33]. Однако существуют и другие варианты, такие как активация с использованием антиген-презентирующих клеток пациента [34] или искусственных антиген-презентирующих клеток [35], недавно разработанная технология Expamer [36].

Третьим этапом производства является собственно генетическая модификация Т-лимфоцитов. На сегодняшний день наиболее широко применяются гамма-ретровирусные и лентивирусные векторы, а также система транспозон/транспозаза. Альтернативой стабильной генетической модификации является методика электропорации для доставки мРНК, в результате которой достигается временная, до 1 нед, экспрессия химерной молекулы.

Гамма-ретровирусные векторы первыми использовали для создания CD19 CAR Т-клеток. На сегодняшний день их применяют в 50 % клинических испытаний. Привлекательны как высокая эффективность, так и большой спектр доступных клеточных линий — продюсеров вирусных частиц. Длительный срок наблюдения за пациентами, получившими терапию Т-лимфоцитами, модифицированными гамма-ретровирусами, продемонстрировал безопасность метода [37, 38]. В отличие от ретровирусной трансдукции гемопоэтических стволовых клеток, при трансдукции Т-лимфоцитов не было зарегистрировано ни одного случая злокачественной трансформации. Более того, было показано, что благодаря возможности создания стабильных клеточных линий — продюсеров [39] использование ретровирусных векторов может обеспечивать большие объемы производства CAR Т-клеток в условиях III фазы клинических испытаний [31].

Лентивирусные векторные системы широко используются для трансдукции неделящихся клеток и теоретически более безопасны с точки зрения риска инсерционного мутагенеза и злокачественной трансформации, что важно, по крайней мере в случае модификации стволовых клеток [40]. Так же как и ретровирусные системы, лентивирусная трансдукция дает высокую эффективность и постоянную стабильную экспрессию химерного рецептора. К минусам лентивирусных векторов относятся отсутствие стабильных линий продюсеров и высокие затраты на производство вектора [41].

Еще один подход, активно тестирующийся в настоящее время, — использование систем транспозон/транспозаза, таких как Sleeping beauty и Piggybag. Преимуществом по отношению к вирусным векторам являются большая биобезопасность и снижение затрат на производство, однако результаты клинического применения данной системы в настоящее время ограничены единичными сообщениями [42].

К временной (в течение 1–2 нед) экспрессии трансгена в цитоплазме приводит мРНК-электропорация, что снимает вопросы о генотоксичности (потенциальном онкогенезе) [43, 44]. Транзиторная экспрессия химерного рецептора является одновременно недостатком и преимуществом системы. Так, эффективность CD19 CAR Т-клеток в значительной степени связана с их экспансией и персистенцией *in vivo*, что при мРНК-электропорации достижимо только с помощью многократных повторных инфузий

терапевтических клеток. С другой стороны, транзиторная экспрессия теоретически делает продукт менее токсичным, и эта система может найти применение при создании химерных рецепторов с перекрестной реактивностью к здоровым тканям.

Четвертым этапом является экспансия модифицированных Т-клеток. Экспансия происходит в биореакторах различных модификаций, с использованием цитокинов, поддерживающих пролиферацию Т-лимфоцитов, — ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15. Наиболее широко применяются биореакторы GE WAVE. Они автоматически поддерживают оптимальный состав среды, температуру, газовый состав воздуха, перемешивают клетки и позволяют быстро нарастить количество клеток до  $10^7$  в 1 мл [45, 46]. Биореактор Prodigy (Miltenyi Biotec) позволяет в полуавтоматическом режиме выполнять последовательность производственных этапов, включая селекцию отдельных популяций, трансдукцию и экспансию Т-лимфоцитов, в закрытой системе [47].

Другой подход — стимуляция пролиферации с помощью искусственных антиген-презентирующих клеток. Так, клеточная линия K-562, экспрессирующая CD32, CD64, CD86, CD137 и мембранную форму ИЛ-15, используется для клинических испытаний CD19-специфичных CAR Т-клеток [42].

Последним этапом перед введением клеток пациенту является контроль качества клеточного продукта — тестирование на микробиологическую безопасность, эффективность трансдукции и функциональную активность Т-лимфоцитов [48].

### Клинические результаты терапии при В-клеточных лимфомах и хроническом лимфолейкозе

С 2008 по 2012 г. было проведено несколько клинических исследований CAR Т-клеток для терапии В-клеточных лимфом. Суммарно были представлены результаты терапии 38 пациентов, страдающих В-НХЛ и получивших терапию CD19 и CD20 CAR Т-клетками 1-го и 2-го поколений [12, 49–55]. Эффективность терапии варьировала, но эти клинические исследования оказали значительное влияние на последующие испытания и развитие технологии в целом.

Введение CD19 CAR Т-клеток 1-го поколения в дозировке от  $2 \times 10^7$  до  $3 \times 10^9$  клеток/м<sup>2</sup> не сопровождалось значимым ответом со стороны опухоли [49, 52], тогда как у пациентов, получивших CAR Т-клетки 2-го поколения, были выявлены увеличенная пролиферативная активность и длительная персистенция эффекторных клеток [51]. Это стало клиническим подтверждением исследований *in vitro*, показавших эффективность CD19 Т-клеток, дополненных CD28 костимулирующим доменом [56].

Группа из MSKCC (Memorial Sloan Kettering Cancer Center — Мемориальный онкологический центр Слоун Кеттеринг, США) показала повышение эффективности терапии CAR Т-клетками в комбинации



с предшествующей лимфодеплетирующей химиотерапией [53]. Благодаря этим данным стало ясно, что одним из условий успешного применения CAR T-клеток является предварительное введение химиотерапевтических препаратов для снижения опухолевой массы и создания «пространства» для пролиферации Т-лимфоцитов.

В дальнейшем в клинических испытаниях использовали различные дозы CAR T-клеток (от  $1,5 \times 10^5$  до  $4 \times 10^8$ ) и комбинации химиопрепаратов, такие как циклофосфамид (ЦФ) + флударабин (ФЛУ) или ЦФ + бендамустин [12, 54]. Все исследовательские группы использовали рецепторы 2-го поколения, однако конструкции различались костимулирующим доменом (4-1BB, CD28) [54, 57, 58] и моноклоном, из которого был заимствован одноцепочечный вариабельный фрагмент. Также появились первые отчеты о токсичности — введение терапевтических клеток сопровождалось повышением концентрации ряда цитокинов и лихорадкой.

Несмотря на то что в первых исследованиях доля пациентов с частичным ответом составила лишь 12 и 21 % [54, 55], в течение следующих 2 лет удалось получить более успешные результаты благодаря оптимизации химиотерапии.

Четырнадцать пациентов с резистентным/рецидивирующим течением ХЛЛ получили терапию CD19 CAR T-клетками с 4-1BBz костимулирующим доменом в дозе от  $0,14 \times 10^8$  до  $11 \times 10^8$  CTL019 клеток. Предшествующее кондиционирование включало ЦФ + ФЛУ или пентостатин + ЦФ или бендамустин. Полный ответ был получен в 29 % случаев, частота суммарного объективного ответа (objective response rate, ORR) составила 57 % [59]. В этой когорте пациентов была обнаружена длительная персистенция терапевтических клеток (до 4 лет). На момент публикации отчета у всех пациентов, достигших полной ремиссии (ПР), ремиссия сохранялась.

В другом исследовании I фазы 15 пациентов (диффузная В-крупноклеточная лимфома — 9, ХЛЛ — 4, индолентные лимфомы — 2) получили кондиционирование ЦФ + ФЛУ и CD19 CAR T-клетки с CD28z костимулирующим доменом в дозе от  $1 \times 10^6$  до  $5 \times 10^6$  клеток/кг. ПР — 53 % (8/15), частичная ремиссия (ЧР) — 27 % (4/15) [32]. В группе пациентов, получавших предшествующее кондиционирование низкими дозами химиопрепаратов, частота полных ответов составила 23 % [60].

В другое исследование было включено 34 пациента с рецидивом/резистентным течением. Основным результатом исследования стало существенное преимущество в частоте полного ответа на терапию (42 против 8 %) в случае использования ЦФ и ФЛУ по сравнению с пациентами, получившими монотерапию ЦФ [61].

В исследовании Пенсильванского университета (UPENN — University of Pennsylvania), США, в когорте 38 пациентов с различными вариантами рецидивов/рефрактерных В-клеточных лимфом общая частота

ответа составила 68 %, а выживаемость без прогрессирования — 62 % при медиане наблюдения 11 мес [62].

Сравнительно недавно было продемонстрировано, что пациенты с ХЛЛ, получавшие терапию ибрутинибом до сбора Т-клеток, показали значительно более высокую скорость экспансии CAR Т-лимфоцитов [63].

Таким образом, CD19 CAR Т-лимфоциты обладают существенной активностью при В-клеточных лимфомах (табл. 1, 2). В ближайшем будущем ожидаются публикации данных многоцентровых исследований, на основании которых будет определено потенциальное место данного вида терапии в программном лечении пациентов с различными В-клеточными опухолями.

### **В-линейный острый лимфобластный лейкоз**

В то время как терапия В-НХЛ CD19 CAR Т-клетками показала работоспособность этой технологии как таковой, наиболее очевидный успех в ее использовании был достигнут в терапии ОЛЛ.

В течение 2 лет ученые нескольких ведущих институтов опубликовали результаты клинических исследований терапии ОЛЛ у взрослых и детей с использованием CD19 CAR Т-клеток [64–68]. Суммарно 67 пациентов (21 взрослый, 45 детей) были включены в клинические испытания.

В исследовании, проведенном в MSKCC, вводились  $3 \times 10^6$  19–28z CAR Т-клеток/кг. Для лимфодеплеции использовали ЦФ в дозе 900 мг/м<sup>2</sup>. В исследование была включена группа из 16 взрослых пациентов с рецидивом или резистентным течением ОЛЛ. Частота ПР составила 88 %, из них 75 % — ремиссии с негативной минимальной остаточной болезнью [45, 46, 49]. ПР сохранялась в среднем 24,5 дня у 70 % пациентов, после чего они получили аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток. В исследовании отмечена быстрая экспансия терапевтических клеток *in vivo* и относительно быстрый, через 1–3 мес, их клиренс. Авторы предполагают, что при таком быстром достижении молекулярной ремиссии ОЛЛ длительная персистенция CAR Т-клеток не является необходимым условием их эффективного применения.

Схожие результаты были получены Национальным институтом рака (National Cancer Institute, NCI), США. В исследовании I фазы в группе пациентов ( $n = 21$ ) с рецидивом/рефрактерным течением В-ОЛЛ до 30 лет использовались 19–28z CAR Т-клетки. Клинико-гематологическая ремиссия была достигнута у 70 % пациентов, молекулярная ремиссия — у 60 % [68]. Персистенция терапевтических клеток составила не более 2 мес. Большинство пациентов, достигших ремиссии, были трансплантированы [68].

В Пенсильванском университете были проведены исследования в группе из 25 детей и 5 взрослых [66, 67]. Большинство пациентов получило кондиционирование ФЛУ и ЦФ за неделю до введения 19-BBz

CAR T-клеток. Введенная доза клеток составила от  $0,8 \times 10^6$  до  $17,4 \times 10^6$  клеток/кг. Частота достижения клинико-гематологической и молекулярной ремиссии равнялась 90 и 73 % соответственно [65]. Ответ

на терапию коррелировал с персистенцией Т-клеток: 3 пациента, не ответившие на терапию, имели самые низкие уровни циркулирующих терапевтических клеток. У 68 % педиатрических больных персистенция

**Таблица 1.** Результаты опубликованных клинических испытаний терапии Т-клетками, модифицированными анти-CD19-химерным антигенным рецептором. Ответ на терапию в зависимости от режима кондиционирования (адаптировано из [28])

**Table 1.** Results of the published clinical studies of therapy using anti-CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cells. Response to therapy depending on conditioning regimen (adapted from [28])

Группа Group	Диагноз (n) Diagnosis (n)	Режим кондиционирования Conditioning regimen	Доза/кг Dose/kg	Ответ на терапию, % Response to therapy, %	
				ПР CR	ЧР PR
MSKCC Brentjens et al. [53]	ХЛЛ (3) CLL (3)	Не проводилось None	$1,2 - 3,0 \times 10^7$	0	0
MSKCC Brentjens et al. [53]	ХЛЛ (4) CLL (4)	ЦФ CP	$0,4 - 1,0 \times 10^7$	0	25
NCI Kochenderfer et al. [12, 55]	ХЛЛ (7) CLL (7)	ФЛУ/ЦФ FLU/CP	$0,3 - 4,0 \times 10^6$	43	43
UPENN Kalos et al. [50] Porter et al. [54]	ХЛЛ (14) CLL (14)	ФЛУ/ЦФ, П/ЦФ, Р/CP бендамустин bendamustine	$0,14 - 11,0 \times 10^8$ (всего) (total)	29	28
NCI Kochenderfer et al. [12, 55]	Другие НХЛ (14) Other NHL (14)	ФЛУ/ЦФ FLU/CP	$0,3 - 5,0 \times 10^6$	36	36

**Сокращения:** НХЛ – неходжкинская лимфома; П/ЦФ – пентостатин/циклофосфамид; ПР – полная ремиссия, ФЛУ/ЦФ – флударабин/циклофосфамид; ХЛЛ – хронический лимфобластный лейкоз; ЦФ – циклофосфамид; ЧР – частичная ремиссия; MSKCC – Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Мемориальный онкологический центр Слоун Кеттеринг; NCI – National Cancer Institute, Национальный институт рака; UPENN – University of Pennsylvania, Университет Пенсильвании  
**Abbreviations:** CLL – chronic lymphocytic leukemia, CP – cyclophosphamide, FLU/CP – fludarabine/cyclophosphamide, CR – complete remission, MSKCC – Memorial Sloan Kettering Cancer Center, NCI – National Cancer Institute, NHL – non-Hodgkin's lymphoma, P/CP – pentostatin/cyclophosphamide; PR – partial remission, UPENN – University of Pennsylvania,

**Таблица 2.** Результаты опубликованных клинических испытаний терапии Т-клетками, модифицированными антиCD19 – химерным антигенным рецептором (адаптировано из [28])

**Table 2.** Results of the published clinical studies of therapy using anti-CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cells (adapted from [28])

Исследование Study	n / медиана возраста, лет n / median age	Предшествующая алло-ТКМ, % Previous allo-BMT, %	Доза/кг Dose/kg	Ответ на терапию Response to therapy		СЦШ / костимулирующий домен CRS / costimulatory domain
				ПР FR	МР MR	
MSKCC Davila et al. [64], Brentjens et al. [65]	16 / 50	25	$3,0 \times 10^6$	88	75	7 19–28z
UPENN Maude et al. [66], Grupp et al. [67]	25 / 11 5 / 47	60	от $8,0 \times 10^6$ до $21,0 \times 10^6$	90	73	22 19BBz
NCI Lee et al. [68]	21	38	от $1,0 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$	67	57	16 19–28z

**Сокращения:** алло-ТКМ – аллогенная трансплантация костного мозга; МР – полная молекулярная ремиссия; ПР – полная ремиссия, СЦШ – синдром цитокинового шторма; MSKCC – Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Мемориальный онкологический центр Слоун Кеттеринг; UPENN – University of Pennsylvania, Университет Пенсильвании; NCI – National Cancer Institute, Национальный институт рака

**Abbreviations:** allo-BMT – allogeneic bone marrow transplantation, FR – full remission, MR – full molecular remission, CRS – cytokine release syndrome; MSKCC – Memorial Sloan Kettering Cancer Center, UPENN – University of Pennsylvania, NCI – National Cancer Institute.



Т-клеток сохранялась в течение 6 мес. У некоторых из них персистенция обнаруживается в течение более 2 лет [65]. Таким образом, в случае использования конструкции с 4-1BB костимуляторным доменом клинический ответ коррелировал с длительным персистированием Т-клеток. Дополнительно было показано, что у 6 пациентов CAR Т-клетки исчезли перед развитием рецидива заболевания, а у 3 из этих 6 было отмечено восстановление нормальных В-клеток, что можно считать суррогатным маркером потери функции CAR Т-клеток.

Одним из важных наблюдений стала потеря экспрессии CD19 опухолевыми клетками при развитии рецидива ОЛЛ после терапии. Согласно данным всех исследовательских групп, этот механизм является ведущим в развитии рецидива ОЛЛ при терапии как CAR Т-клетками, так и биспецифическими препаратами, направленными на CD19. В этой связи одним из возможных решений является одновременное таргетирование нескольких антигенов на поверхности опухоли, что теоретически должно снизить риск «ускользания» опухоли от эффекторных механизмов иммунной системы.

### Множественная миелома

Несмотря на обилие новых фармакологических препаратов для лечения множественной миеломы (ММ), вопрос о куративной терапии остается открытым. В Пенсильванском университете CD19 CAR Т-клетки были использованы для лечения группы пациентов, страдающих ММ. У 4 пациентов из 10 была показана эффективность терапии (ПР — 1, очень хорошая ЧР — 1, ЧР — 2), у оставшихся 6 пациентов — стабилизация (без прогрессии) [69].

В качестве альтернативной мишени для CAR Т-терапии ММ был предложен поверхностный антиген SLAMF7, экспрессирующийся на естественных киллерах (NK-клетках) и плазмочитах. В настоящее время используется препарат моноклональных антител к этому рецептору (элотузумаб), демонстрирующий эффективность при рефрактерном/рецидивирующем течении ММ [70, 71].

Кроме того, исследователи из NCI доложили об 11 пациентах с рецидивирующим/резистентным течением ММ, включенных в I фазу клинических исследований с применением CAR Т-клеток к антигену созревания В-клеток (В cell maturation antigen, BCMA). Медиана числа предшествующих линий терапии для пациентов, включенных в протокол, была равна 7. Кондиционирование проводилось ЦФ с ФЛУ с последующим введением CAR Т-клеток в дозе от  $0,3 \times 10^6$  до  $9 \times 10^6$ . Один из 3 пациентов из группы со средней дозой достиг статуса очень хорошего частичного ответа, оба пациента из группы с наибольшей дозой CAR Т-клеток продемонстрировали хороший ответ, в том числе ПР — у 1 из 2 пациентов [72]. Поскольку

экспрессия BCMA в основном ограничена плазматическими клетками, этот антиген служит хорошей мишенью как для CAR Т-клеток, так и для моноклональных антител и может быть использован в качестве индивидуальной мишени или для создания биспецифических (SLAMF7/BCMA) препаратов [73, 74].

### Солідные опухоли

Успех терапии CAR Т-клетками при В-ОЛЛ и В-НХЛ стал доказательством терапевтического потенциала генетически модифицированных Т-лимфоцитов и проложил путь для клинических испытаний при других заболеваниях.

Необходимо отметить, что в адоптивной иммунотерапии солидных опухолей существует несколько принципиальных проблем:

- 1) ограниченное количество идентифицированных антигенов, пригодных для таргетирования химерными рецепторами;
- 2) наличие в опухоли иммуносупрессивного микроокружения;
- 3) ограниченная эффективность миграции терапевтических клеток в ткань опухоли.

Несмотря на это многие группы активно работают над созданием CAR Т-клеток к солидным опухолям. В качестве мишеней используются раково-эмбриональный антиген (carcinoembryonic antigen, CEA), диганглиозид GD2, мезотелин (NCT02414269, NCT02465983) [75],  $\alpha$ -цепь рецептора интерлейкина 13 (IL-13R $\alpha$ ), рецептор эпидермального фактора роста (human epidermal growth factor receptor-2, HER2) [76], белок активации фибробластов (fibroblast activation protein, FAP), молекула клеточной адгезии L1 (L1CAM) и другие [24, 77]. Наиболее успешными являются клинические испытания GD2 CAR Т-клеток для терапии нейробластомы (3 из 11 пациентов достигли ПР) и HER2-CAR для терапии саркомы (у 4 из 17 пациентов достигнута стабилизация) [11, 76] (табл. 3).

### Осложнения терапии CAR Т-клетками

В клинических исследованиях CAR Т-клеток был выявлен ряд побочных эффектов, как предсказанных на основании доклинических данных, так и впервые выявленных при использовании у человека (рис. 5). К наиболее распространенным побочным эффектам относятся В-лимфопения, синдром цитокинового шторма (СЦШ) и нейротоксичность [64–68].

Основным предсказанным побочным эффектом является В-лимфопения, обусловленная закономерной деплецией пула нормальных В-лимфоцитов. В-клеточная аплазия сохраняется в течение всего срока персистенции CD19 CAR Т-клеток и сопровождается гипогаммаглобулинемией, требующей заместительной терапии внутривенным иммуноглобулином. Как указано выше, В-клеточная аплазия

**Таблица 3.** Примеры мишеней, используемых в клинических испытаниях Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (адаптировано из [78])

**Table 3.** Examples of chimeric antigen receptor targets in clinical trails (adapted from [78])

Мишень Target	Заболевание Disease	Клинические испытания Clinical trials
<b>CD19/CD20</b>		
CD19 или CD20 CD 19 or CD20	Лейкозы Leukemias	NCT01860937, NCT02146924, NCT02228096, NCT02435849, NCT02028455, NCT02614066, NCT02625480, NCT01747486, NCT02030847, NCT02535364, NCT01683279
	Лейкозы/Лимфома Leukemia/Lymphoma	NCT02443831, NCT02529813, NCT02546739, NCT01430390, NCT01853631, NCT02050347, NCT02456350, NCT02081937, NCT02132624, NCT02349698, NCT01475058, NCT02537977
	Лимфома Lymphoma	NCT02650999, NCT02431988, NCT02631044, NCT02445248, NCT02277522, NCT02624258, NCT01493453, NCT01840566, NCT02134262, NCT02247609, NCT02348216, NCT02030834
	Множественная миелома Multiple myeloma	
<b>Дополнительные мишени для гематологических заболеваний Additional targets for hematological diseases</b>		
CD22	В-клеточные заболевания B-cell disorders	NCT02588456, NCT02315612
Легкая цепь Igκ Igκ light chain	В-клеточные заболевания B-cell disorders	
CD30	Лимфома Lymphoma	NCT02259556, NCT02274584
CD138	Множественная миелома Multiple myeloma	
BCMA	Множественная миелома Multiple myeloma	
CD33	Миелоидные заболевания Myeloid disorders	NCT02546167, NCT02215967
CD123	Миелоидные заболевания Myeloid disorders	
Лиганды NKG2D NKG2D ligands	Различные гематологические заболевания Various hematological disorders	NCT02623582, NCT02159495
ROR1	Лейкоз Leukemia	NCT02203825
<b>Мишени для солидных опухолей Targets for solid tumors</b>		
EGFR	EGFR+ солидные опухоли EGFR+ solid tumors	NCT02331693
EGFRvIII	Глиобластома Glioblastoma	NCT02209376
GD2	Нейробластома, саркома Юинга, остеосаркома и меланома Neuroblastoma, Ewing's sarcoma, and melanoma	NCT01822652, NCT02107963
IL-13Rα2	Глиома Glioma	NCT02208362

Окончание табл. 3

End tab. 3

Мишень Target	Заболевание Disease	Клинические испытания Clinical trials
HER2	HER2+ солидные опухоли HER2+ solid tumors	
Мезотелин Mesothelin	Мезотелиома, рак поджелудочной железы и рак яичников Mesothelioma, pancreatic cancer, and ovarian cancer	NCT02159716, NCT02414269, NCT01897415, NCT02580747, NCT02465983
PSMA	Рак предстательной железы Prostate cancer	NCT01140373
FAP	Злокачественная мезотелиома плевры Malignant pleural mesothelioma	NCT01722149
GPC3	Гепатокарцинома Hepatocellular carcinoma	NCT02395250
MET	Рак груди Breast cancer	NCT01837602
MUC16	Рак яичников Ovarian cancer	NCT02498912
CEA	Различные солидные опухоли Various solid tumors	NCT02349724, NCT01723306
Lewis-Y	Солидные опухоли и миелоидные заболевания Solid tumors and myeloid disorders	NCT01716364
MUC1	Гепатокарцинома, карцинома поджелудочной железы и трижды негативный рак молочной железы Hepatocellular carcinoma, pancreatic cancer, and triple negative breast cancer	NCT02617134, NCT02587689

**Сокращения:** ВСМА — антиген созревания В-клеток (B cell maturation antigen), EGFR — рецептор эпидермального фактора роста, HER2 — рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа, PSMA — простат-специфический мембранный антиген, FAP — белок активации фибробластов, MUC16 — муцин-16, CEA — раково-эмбриональный антиген, MUC1 — муцин-1. Abbreviations: BCMA — B cell maturation antigen, EGFR — epidermal growth factor receptor, HER2 — human epidermal growth factor receptor-2, PSMA — prostate-specific membrane antigen, FAP — fibroblast activation protein, MUC16 — mucin 16, CEA — carcinoembryonic antigen, MUC1 — mucin 1.

является классическим примером on target/off tumor эффекта специфической иммунотерапии, обусловленной экспрессией таргетируемого антигена на поверхности здоровых тканей. В случае CD19 CAR T-клеток данный эффект не угрожает жизни пациентов, может быть скорректирован отработанными клиническими инструментами и не рассматривается как противопоказание к применению метода, по крайней мере в контексте терапии пациентов с рецидивами и рефрактерными формами В-клеточных опухолей.

СЦШ — наиболее тяжелый побочный эффект терапии CAR T-клетками, описанный всеми крупными исследовательскими группами.

СЦШ является потенциально жизнеугрожающим состоянием, сопровождающим терапевтическое введение как моноклональных антител [80, 81], биспецифических антител [82], так и Т-клеток, экспрессирующих CAR [64, 83, 84].

СЦШ — состояние, близкое к таким заболеваниям, как гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз и синдром активации моноцитов/макрофагов. В основе лежит системный воспалительный ответ, обусловленный гиперпродукцией провоспалительных цитокинов. Источником цитокинов являются как собственно CAR T-клетки, так и вторичные эффекторы. Тяжесть течения СЦШ варьирует и может достигать полиорганной недостаточности и летального исхода.

Клиника СЦШ включает лихорадку, нарушение дыхательной функции, тахикардию, гипотензию, генерализованные отеки, нарушение сознания, диффузную лимфаденопатию, гепатоспленомегалию и часто эритематозную или зудящую сыпь. Эта симптоматика появляется вскоре после введения модифицированных Т-клеток и нарастает в течение последующих дней. Было показано, что СЦШ ассоциирован с повышенными уровнями цитокинов, в том числе интерлейкина 6 (ИЛ-6)



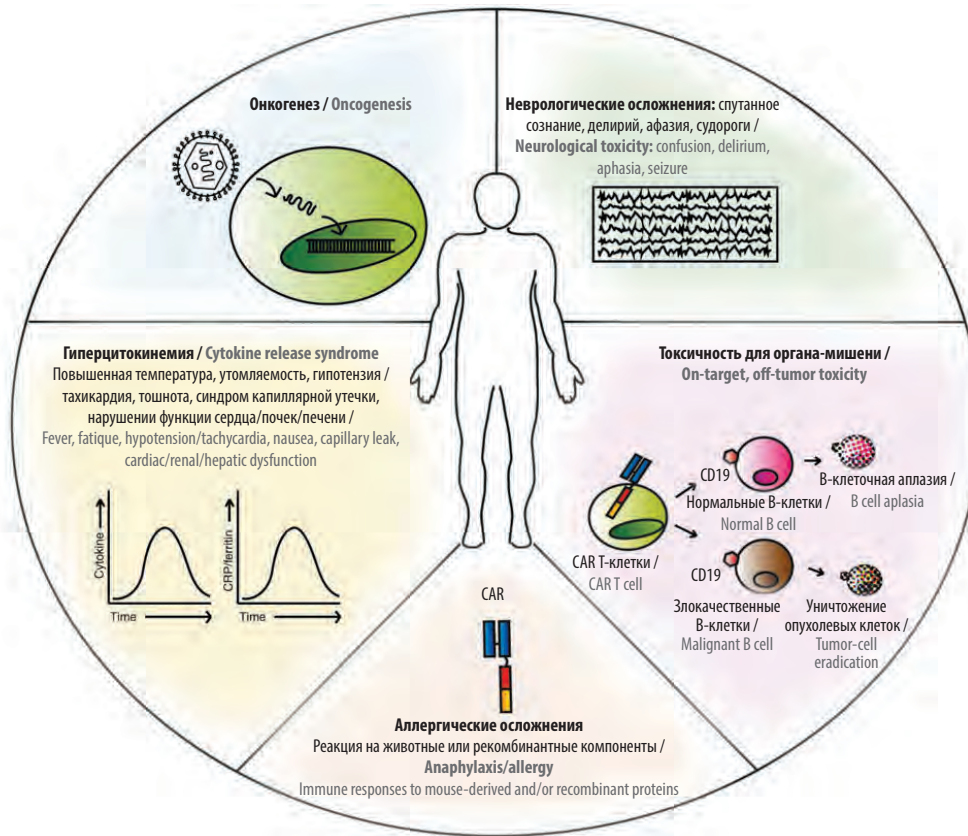


Рис. 5. Осложнения терапии Т-клетками, экспрессирующими химерный антигенный рецептор (адаптировано из [79])  
Fig. 5. Complications of therapy using T-cells expressing chimeric antigen receptors (adapted from [79])

и интерферона  $\gamma$ , и тяжесть проявлений синдрома зависит от изначальной опухолевой массы [81, 85]. Терапия СЦШ включает применение кортикостероидов и антагониста рецептора ИЛ-6 — препарата тоцилизумаб. Таргетная иммуносупрессия тоцилизумабом позволяет в ряде случаев избежать необходимости назначения кортикостероидов, оказывающих негативное влияние на функциональность CAR T-клеток [64, 86]. В настоящее время ведется разработка стандартов градации и протоколов лечения СЦШ [85].

Третьим серьезным побочным эффектом CD19 CAR T-клеток является нейротоксичность, проявляющаяся спутанностью сознания, делирием, афазией, миоклонусом, судорогами, галлюцинациями. У части пациентов нейротоксичность совпадает по времени с развитием СЦШ, однако может наблюдаться изолированно. Механизм развития и прогностические факторы нейротоксичности не установлены, что в значительной степени обусловлено отсутствием адекватной животной модели. Не ясно также, является ли нейротоксичность специфическим побочным эффектом, связанным с таргетированием CD19, или универсальным побочным эффектом CAR T-клеток.

### Проблемы и перспективы развития

Очевидно, что адоптивная иммунотерапия генетически модифицированными Т-лимфоцитами как кли-

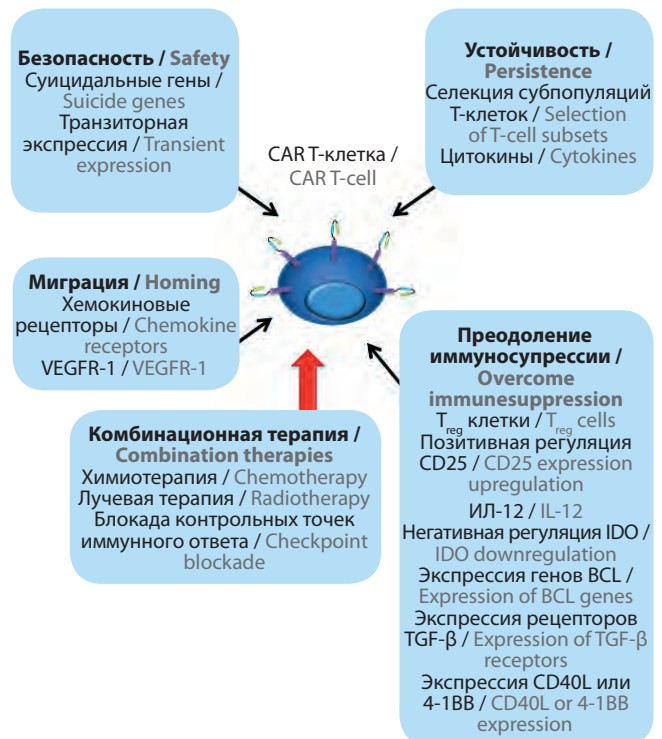


Рис. 6. Основные параметры и методы повышения эффективности модифицированных Т-клеток (адаптировано из [87])  
Fig. 6. Main parameters and methods of increasing effectiveness of modified T-cells (adapted from [87])

ническая технология находится в фазе экспоненциального роста. Существующие платформы, безусловно, нуждаются в совершенствовании с точки зрения как безопасности, так и эффективности терапии (рис. 6).

В области безопасности наиболее ожидаемым новшеством является интеграция в CAR Т-лимфоциты молекулярных механизмов, позволяющих «выключать» терапевтические клетки в случае развития нежелательных побочных эффектов. Одним из способов такого «выключения» служит трансдукция Т-лимфоцитов так называемыми суицидальными генами (suicidal genes), продукты которых под действием специфических малых молекул запускают апоптоз Т-лимфоцитов. На сегодняшний день в клинических испытаниях CAR эффективно используются 2 суицидальных гена: индуцируемая система Caspase-9 и тимидинкиназа герпес-вируса человека (HSV1-TK) [88–91]. Последний может также быть использован в качестве репортерного гена для позитронно-эмиссионной визуализации локализации CAR-Т клеток с использованием HSV1-TK-авидных радиофармпрепаратов [92].

Эффективность CAR Т-лимфоцитов ограничена рядом факторов, значимость которых варьирует в зависимости от таргетируемой опухоли. Так, основным механизмом, обуславливающим резистентность В-ОЛЛ к CD19 CAR Т-клеткам, является потеря экспрессии CD19 на поверхности опухолевых клеток. При солидных опухолях, помимо потери таргетируемого антигена, резистентность может быть обусловлена ограничением трафика Т-лимфоцитов в опухоль и иммуносупрессивным воздействием на CAR Т-клетки со стороны опухолевых клеток и/или клеток микроокружения.

Возможным решением проблемы потери экспрессии антигена опухолевыми клетками является создание биспецифичных CAR Т-клеток [93], так, для контроля В-клеточных новообразований предполагается комбинированное таргетирование CD19, CD22, CD20 и других линейно-специфичных молекул.

С целью преодоления ингибирующих сигналов разрабатывается целый спектр решений, потенциально способных увеличить эффективность терапии в неблагоприятных условиях иммуносупрессивного микро-

окружения. Параллельно многочисленным клиническим испытаниям CAR 2-го поколения ведется доклиническая работа по усовершенствованию и оптимизации существующих конструкций — создание «бронированных» CAR, защищенных от иммуносупрессивного воздействия стромы. Проводятся активные исследования, направленные на более глубокое понимание строения микроокружения опухоли, секрецию цитокинов и молекул, ингибирующих иммунный ответ [88].

Одной из стратегий преодоления иммуносупрессивного воздействия является комбинированная терапия CAR Т-клетками с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа, например PD-1, для предотвращения «истощения» Т-клеток [88, 94, 95].

Другая возможная стратегия — использование CAR Т-клеток, экспрессирующих как сам антигенный рецептор, так и хемокиновые рецепторы CXCR2 (CXCL1 receptor)/CCR4 (CCL17 receptor)/Gro-a/CCL17/CCL2, улучшающие миграцию терапевтических клеток и таким образом увеличивающие эффективность терапии [96, 97].

Активно развивающаяся технология — Т-клетки, экспрессирующие CAR и секретирующие цитокины, такие как ИЛ-12 [98, 99].

### Заключение

Технология использования Т-клеток с CAR — это метод, показавший беспрецедентную эффективность в терапии В-линейного ОЛЛ и обнадеживающие результаты при других В-клеточных опухолях.

Ближайшие годы покажут, сможет ли эта технология заменить аллогенную трансплантацию костного мозга в терапии ОЛЛ, удастся ли упростить и удешевить процедуру создания терапевтических клеток благодаря разработке новых методик доставки генетического материала, а также станет ли она широко используемой терапией онкологических заболеваний в целом (в том числе солидных опухолей) или останется нишевой терапией «спасения» для В-клеточных заболеваний.

Основной проблемой на пути CAR Т-клеточной терапии в онкологии является трудность идентификации опухоль- или ткань-специфичных антигенов, обеспечивающих необходимую селективность терапевтического воздействия.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). Доступно по: [http://www.oncology.ru/service/statistics/malignant\\_tumors](http://www.oncology.ru/service/statistics/malignant_tumors). [Malignancies in Russia in 2015 (morbidity and mortality). Available at: [http://www.oncology.ru/service/statistics/malignant\\_tumors](http://www.oncology.ru/service/statistics/malignant_tumors). (In Russ.)].
2. Irving B.A., Weiss A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor — associated signal transduction pathways. *Cell* 1991;64:891–901. PMID: 1705867.
3. Romeo C., Amiot M., Seed B. Sequence requirements for induction of cytotoxicity by the T cell antigen/Fc receptor zeta chain. *Cell* 1992;68:889–97. PMID: 1547489.
4. Eshhar Z., Waks T., Gross G., Schindler D.G. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:720–4. PMID: PMC45737.
5. Newick K., Moon E., Albelda S.M. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for solid tumors. *Mol Ther Oncolytics* 2016;3:16006. DOI: 10.1038/mt.2016.6.

6. Eshhar Z., Bach N., Fitzer-Attas C.J. et al. The T-body approach: potential for cancer immunotherapy. Springer Semin Immunopathol 1996;18(2):199–209. PMID: 8908700.
7. Gong M.C., Latouche J.B., Krause A. et al. Cancer patient T cells genetically targeted to prostate-specific membrane antigen specifically lyse prostate cancer cells and release cytokines in response to prostate-specific membrane antigen. Neoplasia 1999;1:123–7. PMID: 10933046.
8. Kershaw M.H., Westwood J.A., Parker L.L. et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. Clin Cancer Res 2006;12(20 pt 1):6106–15. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1183.
9. Lamers C.H., Sleijfer S., Vulto A.G. et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. J Clin Oncol 2006;1;24(13):e20–2. DOI: 10.1200/JCO.2006.05.9964.
10. Haynes N.M., Trapani J.A., Teng M.W. et al. Single-chain antigen recognition receptors that costimulate potent rejection of established experimental tumors. Blood 2002;100:3155–63. DOI: 10.1182/blood-2002-04-1041.
11. Hombach A., Heuser C., Marquardt T. et al. CD4+ T cells engrafted with a recombinant immunoreceptor efficiently lyse target cells in a MHC antigen- and Fas-independent fashion. J Immunol 2001;167:1090–6. PMID: 11441120.
12. Kochenderfer J.N., Wilson W.H., Janik J.E. et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. Blood 2010;116(20): 4099–102. DOI: 10.1182/blood-2010-04-281931.
13. Gill S., Maus M.V., Porter D.L. Chimeric antigen receptor T cell therapy: 25 years in the making. Blood Rev 2016;30(3):157–67. DOI: 10.1016/j.blre.2015.10.003.
14. Wilkie S., Picco G., Foster J. et al. Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. J Immunol 2008;180:4901–9. PMID: 18354214.
15. Pule M.A., Straathof K.C., Dotti G. et al. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. Mol Ther 2005;12:933–41. DOI: 10.1016/j.ymthe.2005.04.016.
16. Wang J., Jensen M., Lin Y. et al. Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains. Hum Gene Ther 2007;18:712–25. DOI: 10.1089/hum.2007.028.
17. Maher J., Wilkie S. CAR mechanics: driving T cells into the MUC of cancer. Cancer Res 2009;69(11):4559–62. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0564.
18. Sadelain M., Brentjens R., Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. Cancer Discov 2013;3(4):388–98. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0548.
19. Gan H.K., Burgess A.W., Clayton A.H., Scott A.M. Targeting of a conformationally exposed, tumor-specific epitope of EGFR as a strategy for cancer therapy. Cancer Res 2012;72(12):2924–30. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3898.
20. Sampson J.H., Heimberger A.B., Archer G.E. et al. Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. J Clin Oncol 2010;28(31):4722–9. DOI: 10.1200/JCO.2010.28.6963.
21. Krogsgaard M., Davis M.M. How T cells 'see' antigen. Nat Immunol 2005;6:239–45. DOI: 10.1038/ni1173.
22. Rapoport A.P., Stadtmauer E.A., Binder-Scholl G.K. et al. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. Nat Med 2015;21(8):914–21. DOI: 10.1038/nm.3910.
23. Morgan R.A., Chinnsamy N., Abate-Daga D. et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. J Immunother 2013;36(2):133–51. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3182829903.
24. Kakarla S., Gottschalk S. CAR T cells for solid tumors: armed and ready to go? Cancer J 2014;20(2):151–5. DOI: 10.1097/PPO.000000000000032.
25. Li Y.S., Wasserman R., Hayakawa K., Hardy R.R. Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. Immunity 1996;5:527–35. PMID: 8986713.
26. Li Y.S., Hayakawa K., Hardy R.R. The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. J Exp Med 1993;178:951–60. PMID: PMC2191150.
27. Maher J., Brentjens R.J., Gunset G. et al. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta/CD28 receptor. Nat Biotechnol 2002;20:70–5. DOI: 10.1038/nbt0102-70.
28. Davila M.L., Sadelain M. Biology and clinical application of CAR T cells for B cell malignancies. Int J Hematol 2016;104:6–17. DOI: 10.1007/s12185-016-2039-6.
29. Topp M.S., Gökbuğut N., Stein A.S. et al. Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. Lancet Oncol 2015 Jan;16(1):57–66. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)71170-2.
30. Kochenderfer J.N., Rosenberg S.A. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. Nat Rev Clin Oncol 2013 May;10(5):267–76. DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.46.
31. Wang X., Rivière I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. Mol Ther Oncolytics 2016;3:16015. DOI: 10.1038/mto.2016.15.
32. Kochenderfer J.N., Dudley M.E., Kassim S.H. et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. J Clin Oncol 2015;33:540–9. DOI: 10.1200/JCO.2014.56.2025.
33. Wang X., Stefanski J., Borquez-Ojeda O. et al. Comparison of CTS Dynabeads CD3/CD28, Miltenyi TransAct CD3/28 and ExpAct beads for large-scale CAR T cell manufacturing. European Society of Gene and Cell Therapy Collaborative Congress 2015, Helsinki, Finland. A31.
34. Vacchelli E., Vitale I., Eggermont A. et al. Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy. Oncoimmunology 2013;2:e25771. DOI: 10.4161/onci.25771.
35. Kim J.V., Latouche J.B., Rivière I., Sadelain M. The ABCs of artificial antigen presentation. Nat Biotechnol 2004;22:403–10. DOI: 10.1038/nbt955.
36. Bashour K.T., Graef P., Stemmer C. et al. Functional characterization of a T cell stimulation reagent for the production of therapeutic chimeric antigen receptor T cells. ASH 57th Annual Meeting & Exposition, 2015, Orlando, FL.
37. Sadelain M., Papapetrou E.P., Bushman F.D. Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. Nat Rev Cancer 2011;12(1):51–8. DOI: 10.1038/nrc3179.
38. Suerth J.D., Schambach A., Baum C. Genetic modification of lymphocytes by retrovirus-based vectors. Curr Opin Immunol 2012;24(5):598–608. DOI: 10.1016/j.coi.2012.08.007.
39. Ghani K., Wang X., de Campos-Lima P.O. et al. Efficient human hematopoietic cell transduction using RD114- and GALV-pseudotyped retroviral vectors produced in suspension and serum-free media. Hum Gene Ther 2009;20:966–74. DOI: 10.1089/hum.2009.001.
40. Vannucci L., Lai M., Chiuppesi F. et al. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. New Microbiol 2013;36:1–22. PMID: 23435812.
41. Throm R.E., Ouma A.A., Zhou S. et al. Efficient construction of producer cell lines for a SIN lentiviral vector for SCID-X1 gene therapy by concatemeric array transfection. Blood 2009;113:5104–10. DOI: 10.1182/blood-2008-11-191049.
42. Singh H., Huls H., Kebriaei P., Cooper L.J. A new approach to gene therapy using Sleeping Beauty to genetically modify clini-



- cal-grade T cells to target CD19. *Immunol Rev* 2014;257:181–90.  
DOI: 10.1111/immr.12137.
43. Zhao Y., Zheng Z., Cohen C.J. et al. High-efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation. *Mol Ther* 2006;13(1):151–9.  
DOI: 10.1016/j.ymthe.2005.07.688.
  44. Birkholz K., Hombach A., Krug C. et al. Transfer of mRNA encoding recombinant immunoreceptors reprograms CD4+ and CD8+ T cells for use in the adoptive immunotherapy of cancer. *Gene Ther* 2009;16(5):596–604.  
DOI: 10.1038/gt.2008.189.
  45. Hollyman D., Stefanski J., Przybylowski M. et al. Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy. *J Immunother* 2009;32:169–80.  
DOI: 10.1097/CJI.0b013e318194a6e8.
  46. Levine B.L. Performance-enhancing drugs: design and production of redirected chimeric antigen receptor (CAR) T cells. *Cancer Gene Ther* 2015;22:79–84.  
DOI: 10.1038/cgt.2015.5.
  47. Kumaresan P., Figliola M., Moyes J.S. et al. Automated cell enrichment of cytomegalovirus-specific T cells for clinical applications using the cytokine-capture system. *J Vis Exp* 2015;(104). DOI: 10.3791/52808.
  48. Wang X., Riviere I. Manufacture of tumor- and virus-specific T lymphocytes for adoptive cell therapies. *Cancer Gene Ther* 2015;22:85–94. DOI: 10.1038/cgt.2014.81.
  49. Jensen M.C., Popplewell L., Cooper L.J. et al. Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16(9):1245–56.  
DOI: 10.1016/j.bbmt.2010.03.014.
  50. Kalos M., Levine B.L., Porter D.L. et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 2011;3(95):95ra73.  
DOI: 10.1126/scitranslmed.3002842.
  51. Savoldo B., Ramos C.A., Liu E. et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest* 2011;121(5):1822–6.  
DOI: 10.1172/JCI46110.
  52. Till B.G., Jensen M.C., Wang J. et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood* 2008;112(6):2261–71.  
DOI: 10.1182/blood-2007-12-128843.
  53. Brentjens R.J., Riviere I., Park J.H. et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood* 2011;118(18):4817–28.  
DOI: 10.1182/blood-2011-04-348540.
  54. Porter D.L., Levine B.L., Kalos M. et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2011;365(8):725–33.  
DOI: 10.1056/NEJMoa1103849.
  55. Kochenderfer J.N., Dudley M.E., Feldman S.A. et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* 2012;119(12):2709–20.  
DOI: 10.1182/blood-2011-10-384388.
  56. Brentjens R.J., Latouche J.B., Santos E. et al. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med* 2003;9(3):279–86.  
DOI: 10.1038/nm827.
  57. Imai C., Mihara K., Andreansky M. et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18(4):676–84.  
DOI: 10.1038/sj.leu.2403302.
  58. Sadelain M. CAR therapy: the CD19 paradigm. *J Clin Invest* 2015;125(9):3392–400.  
DOI: 10.1172/JCI80010.
  59. Porter D.L., Hwang W.T., Frey N.V. et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med* 2015;7(303):303ra139.  
DOI: 10.1126/scitranslmed.aac5415.
  60. Kochenderfer J.N., Somerville R., Lu L. et al. Anti-CD19 CAR T cells administered after low-dose chemotherapy can induce remissions of chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2014;124(21):550.
  61. Turtle C.J., Berger C., Sommermeyer D. et al. Anti-CD19 chimeric antigen receptor-modified T cell therapy for B cell non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: fludarabine and cyclophosphamide lymphodepletion improves in vivo expansion and persistence of CAR-T cells and clinical outcomes. *Blood* 2015;126(23):184.
  62. Schuster S.J., Svoboda J., Dwyer Nasta S. et al. Sustained remissions following chimeric antigen receptor modified T cells directed against CD19 (CTL019) in patients with relapsed or refractory CD19+ lymphomas. *Blood* 2015;126(23):183.
  63. Fraietta J.A., Beckwith K.A., Patel P.R. et al. Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia. *Blood* 2016;127(9):1117–27.  
DOI: 10.1182/blood-2015-11-679134.
  64. Davila M.L., Riviere I., Wang X. et al. Efficacy and toxicity management of 19–28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 2014;6(224):224ra25.  
DOI: 10.1126/scitranslmed.3008226.
  65. Brentjens R.J., Davila M.L., Riviere I. et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 2013;5(177):177ra38.  
DOI: 10.1126/scitranslmed.3005930.
  66. Maude S.L., Frey N., Shaw P.A. et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* 2014;371(16):1507–17.  
DOI: 10.1056/NEJMoa1407222.
  67. Grupp S.A., Kalos M., Barrett D. et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2013;368(16):1509–18.  
DOI: 10.1056/NEJMoa1215134.
  68. Lee D.W., Kochenderfer J.N., Stetler-Stevenson M. et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2015;385(9967):517–28.  
DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3.
  69. Garfall A.L., Maus M.V., Hwang W.T. et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19 for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 2015;373(6):1040–7.  
DOI: 10.1056/NEJMoa1504542.
  70. Danhof S., Gogishvili T., Koch S. et al. CAR-Engineered T Cells Specific for the Elotuzumab Target SLAMF7 Eliminate Primary Myeloma Cells and Confer Selective Fratricide of SLAMF7+ Normal Lymphocyte Subsets. *Blood* 2015;126:115.
  71. Lonial S., Dimopoulos M., Palumbo A. et al. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 2015;373(7):621–31.  
DOI: 10.1056/NEJMoa1505654.
  72. Ali S.A., Shi V., Wang M.L. et al. Remissions of Multiple Myeloma during a First-in-Humans Clinical Trial of T Cells Expressing an Anti-B-Cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor; ASH Annual Meeting, 2015: Late-Breaking Abstracts, p. LBA-1.
  73. Ryan M.C., Hering M., Peckham D. et al. Antibody targeting of B-cell maturation antigen on malignant plasma cells. *Mol Cancer Ther* 2007;6:3009–18.  
DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0464.
  74. Ramadoss N.S., Schulman A.D., Choi S.H. et al. An anti-B cell maturation antigen bispecific antibody for multiple myeloma. *J Am Chem Soc* 2015;137:5288–91.  
DOI: 10.1021/jacs.5b01876.
  75. Geyer M.B., Brentjens R.J. Review: Current clinical applications of chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells. *Cytotherapy* 2016;18(11):1393–409.  
DOI: 10.1016/j.jcyt.2016.07.003.
  76. Ahmed N., Brawley V.S., Hegde M. et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *J Clin Oncol* 2015;33:1688–96.  
DOI: 10.1200/JCO.2014.58.0225.

77. Newick K., O'Brien S., Moon E., Albelda S.M. CAR T-cell therapy for solid tumors. *Annu Rev Med* 2017;68:139–52. DOI: 10.1146/annurev-med-062315-120245.
78. Fesnak A.D., June C.H., Levine B.L. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2016;16(9):566–81. DOI: 10.1038/nrc.2016.97.
79. Bonifant C.L., Jackson H.J., Brentjens R.J., Curran K.J. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther Oncolytics* 2016;3:16011. DOI: 10.1038/mt.2016.11.
80. Wing M.G., Moreau T., Greenwood J. et al. Mechanism of first-dose cytokine-release syndrome by CAMPATH 1-H: involvement of CD16 (FcγRIII) and CD11a/CD18 (LFA-1) on NK cells. *J Clin Invest* 1996;98(12):2819–26. DOI: 10.1172/JCI119110.
81. Suntharalingam G., Perry M.R., Ward S. et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 2006;355(10):1018–28. DOI: 10.1056/NEJMoa063842.
82. Teachey D.T., Rheingold S.R., Maude S.L. et al. Cytokine release syndrome after blinatumomab treatment related to abnormal macrophage activation and ameliorated with cytokine-directed therapy. *Blood* 2013;121(26):5154–7. DOI: 10.1182/blood-2013-02-485623.
83. Morgan R.A., Yang J.C., Kitano M. et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* 2010;18(4):843–51. DOI: 10.1038/mt.2010.24.
84. Brentjens R., Yeh R., Bernal Y. et al. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial. *Mol Ther* 2010;18(4):666–8. DOI: 10.1038/mt.2010.31.
85. Lee D.W., Gardner R., Porter D.L. et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* 2014;124:188–95. DOI: 10.1182/blood-2014-05-552729.
86. Grupp S.A., Porter D.L., Teachey D. et al. CD19-Redirected Chimeric Antigen Receptor T (CART19) Cells Induce a Cytokine Release Syndrome (CRS) and Induction of Treatable Macrophage Activation Syndrome (MAS) That Can Be Managed by the IL-6 Antagonist Tocilizumab (toc). 54th ASH Annual Meeting and Exposition; Atlanta, GA. 2012. Abstract 2604.
87. Dai H., Wang Y., Lu X., Han W. Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. *J Natl Cancer Inst* 2016 Jan 27;108(7):djv439. DOI: 10.1093/jnci/djv439.
88. Zhang H., Ye Z. L., Yuan Z.G. et al. New Strategies for the Treatment of Solid Tumors with CAR-T Cells. *Int J Biol Sci* 2016;12(6):718–29. DOI: 10.7150/ijbs.14405.
89. Jones B.S., Lamb L.S., Goldman F., Di Stasi A. Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer. *Front Pharmacol* 2014;5:254. DOI: 10.3389/fphar.2014.00254.
90. Gargett T., Brown M.P. The inducible caspase-9 suicide gene system as a “safety switch” to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Front Pharmacol* 2014;5:235. DOI: 10.3389/fphar.2014.00235.
91. Ciceri F., Bonini C., Stanghellini M.T. et al. Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study. *Lancet Oncol* 2009;10:489–500. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70074-9.
92. Keu K.V., Witney T.H., Yaghoubi S. et al. Reporter gene imaging of targeted T cell immunotherapy in recurrent glioma. *Sci Transl Med* 2017;9(373). pii: eaag2196. DOI: 10.1126/scitranslmed.aag2196.
93. Zah E., Lin M.Y., Silva-Benedict A. et al. T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. *Cancer Immunol Res* 2016;4(6):498–508. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0231.
94. Hillerdal V., Essand M. Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells for the Treatment of Metastatic Prostate Cancer. *Bio-Drugs* 2015;29:75–89. DOI: 10.1007/s40259-015-0122-9.
95. Hamid O., Robert C., Daud A. et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 2013;369:134–44. DOI: 10.1056/NEJMoa1305133.
96. Craddock J.A., Lu A., Bear A. et al. Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b. *J Immunother* 2010;33:780. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181ee6675.
97. Di Stasi A., De Angelis B., Rooney C.M. et al. T lymphocytes coexpressing CCR4 and a chimeric antigen receptor targeting CD30 have improved homing and antitumor activity in a Hodgkin tumor model. *Blood* 2009;113:6392–402. DOI: 10.1182/blood-2009-03-209650.
98. Chmielewski M., Hombach A.A., Abken H. Of CARs and TRUCKs: chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma. *Immunological reviews*. 2014;257:83–90. DOI: 10.1111/imr.12125.
99. Zhang L., Kerkar S.P., Yu Z. et al. Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12 expression to the tumor environment. *Mol Ther* 2011;19:751–9. DOI: 10.1038/mt.2010.313.