

УДК 571.27; 577.29; 615.038; 615.036.8

ПОТЕНЦИАЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНТИТЕЛ ЧЕКПОЙНТ-ИНГИБИТОРОВ И ЦИТОКИНОВ В АДОПТИВНОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ИММУНОТЕРАПИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫМИ Т-ЛИМФОЦИТАМИ

Обзор

© 2019 П.М. Гершович^{1,2*}, А.В. Карабельский^{1,2},
А.Б. Улитин¹, Р.А. Иванов¹

¹ ЗАО «Биокад», 198515 Санкт-Петербург, Россия;
электронная почта: gershovich@biocad.ru

² Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет,
197376 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 01.03.2019

После доработки 08.04.2019

Принята к публикации 08.04.2019

В данном обзоре приведены данные о структуре и механизме действия химерных антигенных рецепторов, основные аспекты технологии производства и клинического применения CAR-T-терапии для лечения гематологических и солидных злокачественных новообразований. Особый акцент сделан на литературных данных, описывающих стратегии совместного применения CAR-T и иммуноонкологических препаратов на основе чекпойнт-ингибиторов, а также цитокинов. Обзор содержит описание результатов доклинических и клинических исследований комбинаторных эффектов совместного применения CAR-T-терапии, моноклональных антител – чекпойнт-ингибиторов и ряда интерлейкинов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: адоптивная клеточная иммунотерапия, химерный антигенный рецептор, CAR-T, иммуноонкология, антитела чекпойнт-ингибиторы, цитокины, интерлейкины.

DOI: 10.1134/S0320972519070029

Идея создания химерных рецепторов для модификации Т-лимфоцитов была выдвинута израильским ученым Зелигом Эшхаром (Zelig Eshhar) более четверти века назад. В 1989 г. под его руководством группа ученых из Института Вейцмана (Weizmann Institute of Science) получила в своей лаборатории трансгенные Т-лимфоциты, несущие на поверхности химерный Т-клеточный рецептор (chimeric T-cell receptor, TcR). Рецептор представлял собой фьюжн-комплекс из Т-клеточного рецептора и вари-

бельных доменов антитела [1]. Впервые технологии генной инженерии позволили приблизить создание противоопухолевой иммунотерапии, основанной на генетической модификации иммунных клеток человека. Ключевая идея лечения с помощью генетически измененных Т-лимфоцитов – это высокая таргетная специфичность такой клетки и ее способность к персистенции в организме после введения. Несмотря на кажущуюся простоту, эволюция этой концепции заняла более четверти века. Тем не менее сегодня модифицированные химерным антигенным рецептором (CAR, от англ. chimeric antigen receptor) Т-лимфоциты (CAR-T) являются крайне эффективным инструментом адоптивной Т-клеточной иммунотерапии [2].

В настоящее время к основным показаниям для CAR-T-терапии относятся только гематологические опухоли, преимущественно В-клеточ-

Принятые сокращения: CAR – химерный антигенный рецептор (chimeric antigen receptor); CAR-T – Т-лимфоциты, модифицированные химерным антигенным рецептором; IFN- γ – интерферон гамма; IL – интерлейкин; MDSC – миелоидные супрессорные клетки; TAM – макрофаги, ассоциированные с опухолью; TGF- β – трансформирующий фактор роста бета; Treg – регуляторные Т-клетки.

* Адресат для корреспонденции.

ного происхождения. В лечении этих заболеваний CD19-специфичная CAR-T-терапия уже успела продемонстрировать прорывной терапевтический потенциал. Беспрецедентный успех CAR-T-терапии в онкогематологии привел к началу клинических испытаний CAR-T-терапии при солидных опухолях. Однако, вопреки ожиданиям, CAR-T-терапия солидных опухолей до сих пор не смогла достичь сопоставимых по значимости клинических результатов по сравнению с CAR-T-терапией гематоонкологических заболеваний [3]. Несмотря на это, продолжается активная разработка CAR, таргетирующих антигены солидных опухолей с высокой специфичностью. Накапливается все больше доказательств того, что экспрессия антигенов-мишеней на поверхности здоровых клеток, недостаточная способность CAR-T к инфильтрации в очаг опухоли и иммуносупрессивное микроокружение, характерное для большинства солидных опухолей, значительно снижают эффективность применения CAR-T [4]. Разработка подходов к повышению эффективности CAR-T-терапии в борьбе с солидными опухолями является крайне важной задачей, как для ученых, так и для врачей-онкологов. Одной из наиболее очевидных стратегий преодоления резистентности солидных опухолей к CAR-T-терапии может стать их совместное применение с другими типами иммуноонкологических препаратов или молекулами, модулирующими иммунный ответ [5].

В этой обзорной статье обсуждаются структура и механизм действия CAR, основные аспекты технологии производства и дальнейшего применения CAR-T-терапии для лечения гематологических и солидных злокачественных новообразований. Особый акцент сделан на литературных данных, описывающих совместное применение CAR-T и иммуноонкологических препаратов на основе чекпойнт-ингибиторов, а также цитокинов. Обзор содержит описание результатов доклинических и клинических исследований комбинаторных эффектов CAR-T-терапии, моноклональных антител – чекпойнт-ингибиторов и ряда интерлейкинов, часть из которых уже используется в терапии опухолей в качестве самостоятельных препаратов или находится на различных этапах доклинической и клинической разработки.

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ, СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ CAR-T

Принцип CAR-T-терапии основан на введении в организм пациента популяции T-лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности

CAR, способный узнавать опухолевые антигены и связываться с ними, обеспечивая независимое от молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) распознавание мишени и дальнейшую инициацию иммунного ответа [6]. CAR представляет собой химерную белковую молекулу, которая состоит из нескольких доменов природных белков, имеющих различные функции (рис. 1). Внеклеточный домен CAR чаще всего представлен одноцепочечным переменным фрагментом антитела, специфичным к опухолевому антигену (scFv, от англ. single-chain variable fragment), который обеспечивает связывание с опухолевым антигеном. Внутриклеточная часть рецептора состоит из CD3- ζ -цепи и дополнительных сигнальных доменов – фрагментов костимуляторных рецепторов, чаще всего CD28 или 4-1BB (CD137). Эти домены обеспечивают активацию, пролиферацию и реализацию эффекторных функций CAR-T при связывании с антигеном на поверхности опухолевой клетки [7, 8]. В настоящее время разработано и протестировано несколько вариантов CAR, несущих различные комбинации сигнальных и костимуляторных доменов. В зависимости от количества костимуляторных доменов и наличия совместно экспрессирующихся дополнительных элементов выделяют четыре поколения CAR-T. К первому поколению CAR относят рецепторы, не имеющие костимуляторных доменов. В исследованиях *in vitro* клетки проходили несколько циклов деления и подвергались апоптозу, а также характеризовались низкой способностью к секреции цитокинов [9]. Аналогичные данные были получены и в ходе клинических исследований [10, 11]. Позднее при сопоставлении результатов изучения сигнального пути активации T-лимфоцитов было сделано предположение, что помимо непосредственного контакта T-клеточного рецептора (ТКР) и антигена в составе CAR можно использовать костимулирующие молекулы CD28 и CD137 (4-1BB). В результате удалось значительно повысить противоопухолевую активность и персистенцию CAR-T *in vivo* [12–14]. Это открытие привело к появлению следующих поколений CAR, включающих один (второе поколение) или комбинацию из двух костимуляторных доменов (третье поколение) [15]. Сегодня второе поколение CAR получило наибольшее распространение, CD19-специфичные CAR-T на основе второго поколения рецепторов стали первым официально зарегистрированным биомедицинским клеточным продуктом этого типа в мире. Дальнейшее развитие технологии CAR-T, в т.ч. ее применение для лечения солидных опухолей, связывают с CAR так называемого четвертого поколения. Четвер-

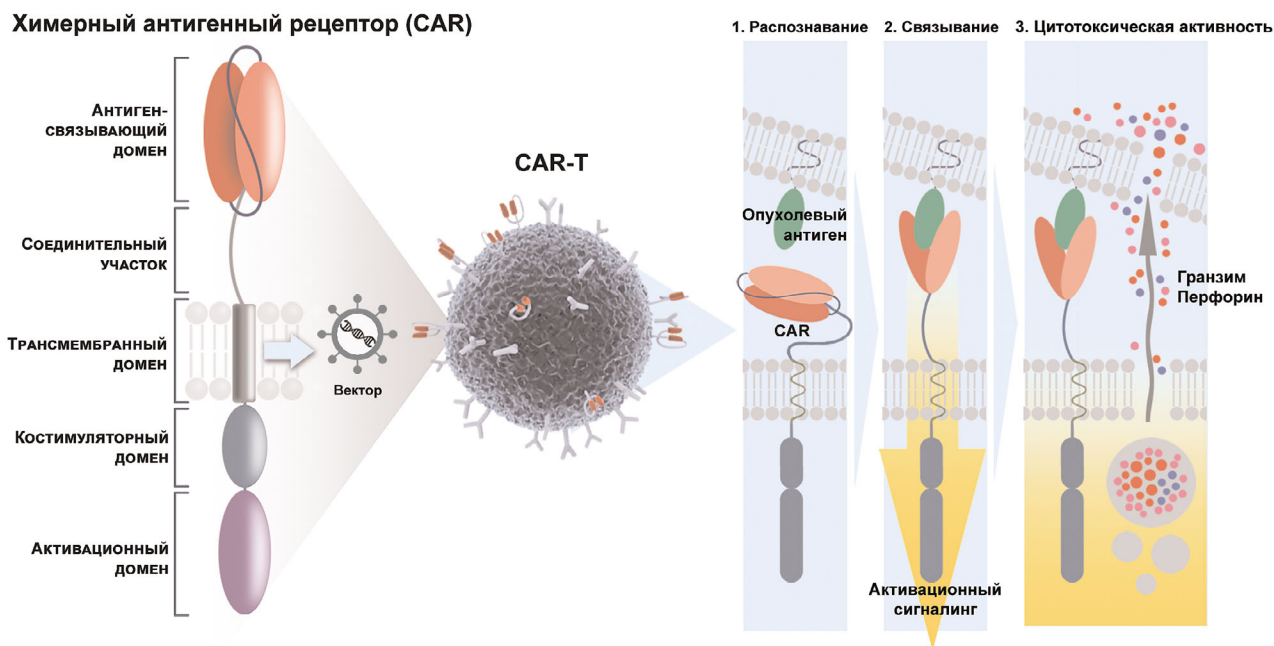


Рис. 1. Структура и принцип действия химерного антигенного рецептора (CAR) второго поколения. С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

тое поколение CAR создано на основе второго поколения, при этом CAR-T одновременно экспрессируют CAR и цитокины, рецепторы цитокинов или химерные комплексы этих молекул [3].

Независимо от конструкции рецептора, его поколения и системы доставки, генетическая модификация и появление CAR на поверхности клетки приводят к приобретению Т-лимфоцитом супрафизиологических свойств к распознаванию и уничтожению клеток опухоли, экспрессирующих целевой антиген. В состоянии покоя внутриклеточная часть химерного рецептора под действием электростатических взаимодействий удерживается на внутренней поверхности плазматической мембраны. Связывание с мишенью индуцирует конформационное изменение CAR, в результате которого активационный сигнал передается через клеточную мембрану Т-лимфоцита внутрь клетки (рис. 2).

В цитоплазме внутриклеточные домены CAR запускают как первичный сигнал активации через CD3 ζ , так и костимулирующий сигнал через костимулирующие домены CD28 или 4-1BB [7, 16]. В настоящий момент принято считать, что в основе молекулярного механизма активации CAR-T через синтетический рецептор лежат те же принципы, что и у природного Т-клеточного рецептора [17], за исключением того, что для запуска сигнального каскада не требуется презентация антигена молекулами МНС. При взаимодействии CAR-T и клетки-мишени

формируется иммунологический супрамолекулярный синапс, созревание которого происходит через пространственное перераспределение как ингибирующих, так и стимулирующих молекул на поверхности клетки (рис. 3).

Для реализации терапевтического эффекта, опосредованного CAR, ключевое значение имеет технология переноса кодирующего его гена в Т-лимфоциты. В процессе получения CAR-T генетическая конструкция, кодирующая CAR и регуляторные элементы, должна быть эффективно доставлена в Т-лимфоциты для их генетической модификации *ex vivo*. В настоящее время для получения CAR-T чаще всего используется доставка генетических конструкций с помощью рекомбинантных вирусных векторов, обеспечивающих стабильную конститутивную экспрессию в клетках. Для этих целей активно применяются γ -ретровирусные и лентивирусные векторы. Необходимо отметить, что оба типа рекомбинантных вирусных векторов осуществляют встраивание генетической конструкции в геном. Исторически γ -ретровирусные векторы первыми были использованы для доставки генетических конструкций в Т-лимфоциты [18]. Они обеспечивают эффективную доставку генетического материала в целевые клетки, что позволяет использовать их в качестве инструмента в масштабном производстве CAR-T для клинического применения [19]. Продолжительные наблюдения за пациентами после введения

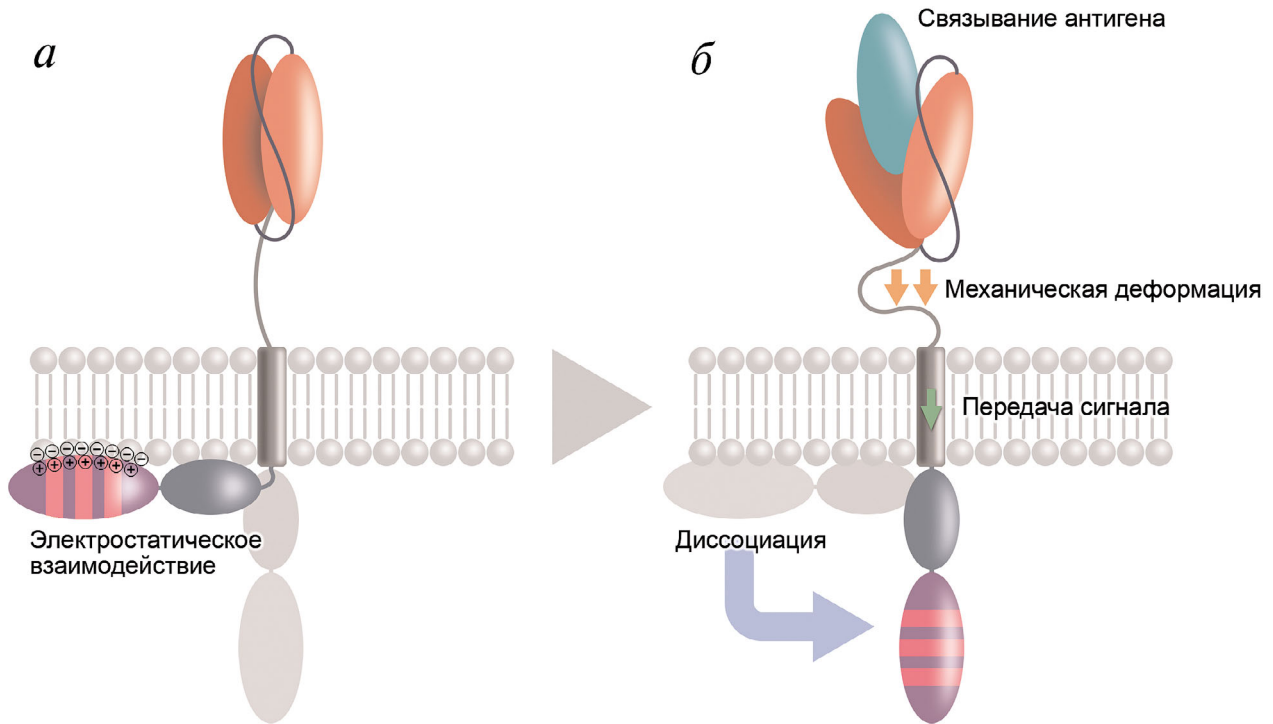


Рис. 2. Пространственная организация CAR в покое (а) и после перехода в активное состояние при связывании специфического антигена на поверхности клетки-мишени (б). С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

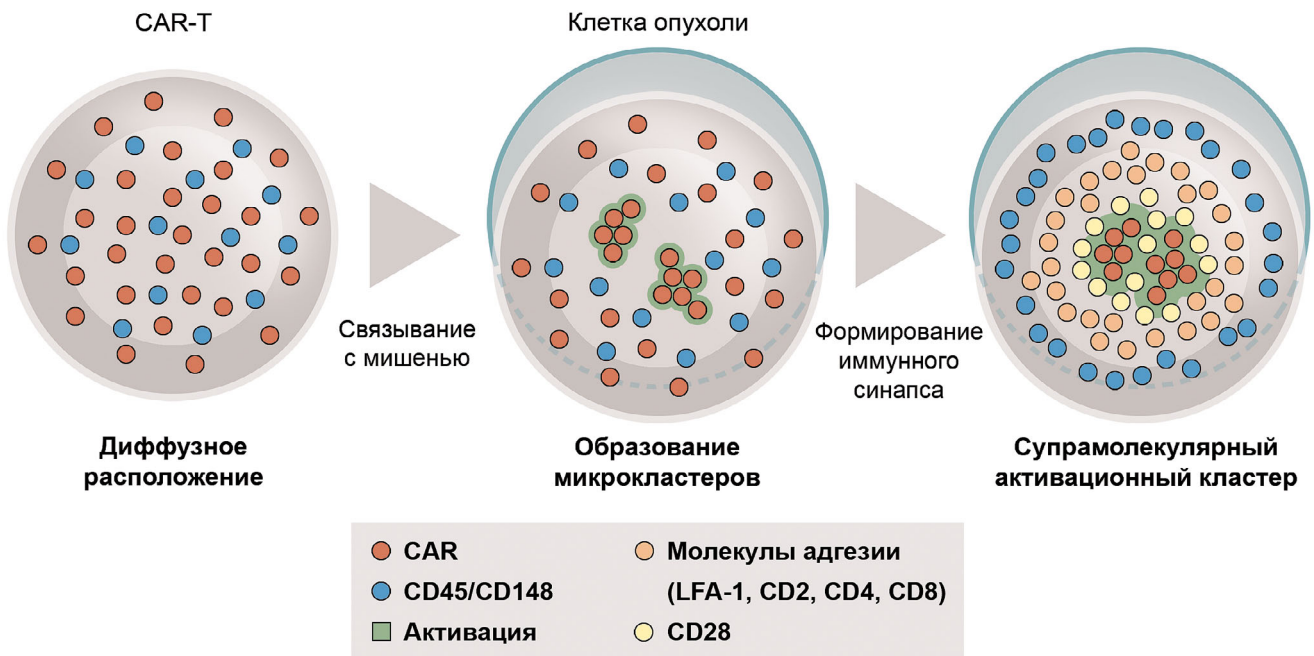


Рис. 3. Процесс образования иммунологического синапса в ходе взаимодействия CAR-T с клеткой-мишенью. С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

CAR-T, произведенных с помощью γ -ретровирусов, в рамках клинических исследований продемонстрировали безопасность этого типа векторов. Спустя более чем 10 лет наблюдений не было показано ни одного случая вектор-опосредованной иммортализации клеток [20]. Тем не менее до сих пор существуют серьезные опасения в безопасности γ -ретровирусных векторов. В литературе описаны случаи инсерционного онкогенеза после применения модифицированных ретровирусными векторами гемопоэтических стволовых клеток для лечения наследственного иммунодефицита (SCID-X1), что привело к развитию Т-клеточного лейкоза у четырех из девяти пациентов [21]. В свою очередь, лентивирусные векторы представляются более безопасной системой доставки с точки зрения риска возникновения инсерционного мутагенеза. В отличие от γ -ретровирусных векторов, они реже встраиваются в области сайта старта транскрипции и CpG-островков. Лентивирусы трансдуцируют не делящиеся клетки, при этом сохраняя высокую эффективность доставки, сравнимую с γ -ретровирусными векторами [22, 23]. В настоящее время оба типа векторов активно используются для наработки CAR-T в масштабе, достаточном для проведения клинических исследований и производства зарегистрированных препаратов CAR-T-терапии [24].

К наиболее эффективным и широко распространенным альтернативным невирусным методам доставки можно отнести систему транспозон/транспозаза, имеющую название Sleeping Beauty, которая применялась для генетической модификации Т-лимфоцитов, в т.ч. для клинических исследований [25]. Эта система переноса генов показала свою эффективность и относительную безопасность [26] и с уверенностью может рассматриваться в качестве альтернативы вирусным векторам, особенно в тех случаях, когда речь идет о модификации клеток *ex vivo*. Исследователи активно работают над совершенствованием этого типа векторов, и в последнее время накапливается все больше доказательств эффективности внедрения этой технологии в процесс получения CAR-T [27]. По сравнению с классическими плазмидными векторами, система Sleeping Beauty является значительно более эффективной, менее токсичной и обеспечивает преимущество перед вирусными векторами на основе ретровирусов и лентивирусов с экономической точки зрения. Есть основания предполагать, что переход на невирусные системы доставки генов с использованием этой или аналогичной, более совершенной, технологии может стать новым стандартом для процесса получения CAR-T в следующие несколько лет.

ПРИМЕНЕНИЕ CAR-T-ТЕРАПИИ В КЛИНИКЕ

На текущий момент Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) уже одобрены к применению два препарата на основе CD19-специфичной аутологичной CAR-T-терапии. Препарат Kymriah (tisagenlecleucel) компании «Novartis» (США) был зарегистрирован 30 августа 2017 г. для лечения пациентов в возрасте до 25 лет с В-клеточным острым лимфобластным лейкозом (В-ОЛЛ). Препарат Yescarta (axicabtagene ciloleucel) компании «Kite Pharma» (США) был одобрен 18 октября 2017 г. для лечения взрослых пациентов с рецидивирующей или рефрактерной диффузной В-крупноклеточной лимфомой. Совсем недавно, 1 мая 2018 г., препарат Kymriah также был одобрен для лечения В-клеточных лимфом. 27 августа 2018 г. на основании рекомендательного решения Европейского агентства по лекарственным препаратам (European Medicines Agency, EMA) препараты Kymriah и Yescarta также были одобрены Европейской комиссией к применению в странах Европейского союза. Кроме того, на продвинутых этапах разработки находится еще несколько препаратов этого класса, в частности JCAR017 (lisocabtagene maraleucel; «Juno Therapeutics, Inc.»/«Celgene», США; анти-CD19 CAR), bb2121 («Bluebird Bio», США; ВСМА-специфичные CAR-T) и некоторые другие. Препарат bb2121 разрабатывается для терапии множественной миеломы – нового показания к применению CAR-T.

Производственный цикл зарегистрированных аутологичных CAR-T-препаратов занимает 2–3 недели и начинается в медицинском центре с забора мононуклеарных клеток крови пациента посредством лейкофереза. Все дальнейшие манипуляции осуществляются в биотехнологической лаборатории. Полученная клеточная масса подвергается очистке от буферных растворов и антикоагулянтов, после чего с помощью проточного элютриационного центрифугирования клетки разделяют по их размеру. Выделенные Т-лимфоциты затем помещают в биореактор для их активации, генетической модификации с помощью рекомбинантных вирусных векторов и последующего культивирования до достижения терапевтической дозы CAR-T. После культивирования суспензию CAR-T центрифугируют и очищают от нежелательных компонентов среды и реагентов, концентрируют до целевого объема инфузии. Упакованный CAR-T-клеточный продукт чаще всего подвергают криоконсервации и в замороженном состоянии на-

правляют в медицинский центр. Инфузию проводят однократно в предустановленной для пациента дозе, в зависимости от массы тела. За несколько дней до инфузии пациент проходит короткий курс системной химиотерапии (как правило, с применением циклофосфида и флударабина) с целью частичной деплеции эндогенных Т-лимфоцитов [24] (рис. 4).

CAR-T-терапия уже успела продемонстрировать убедительные успехи в онкогематологии. К основным показаниям для CAR-T-терапии относятся гематологические опухоли, преимущественно В-клеточного происхождения. При В-клеточных лимфопролиферативных новообразованиях оказались наиболее эффективны CAR-T, которые нацелены на связывание с маркером нормальных и трансформированных В-клеток – поверхностным антигеном CD19. Среди потенциальных В-клеточных мишеней CD19 – один из наиболее предпочтительных поверхностных антигенов для таргетирования при помощи CAR-T. Его преимущества обусловлены универсальной экспрессией на поверхности всех В-лимфоцитов и отсутствием экспрессии в любых других клетках и тканях. В сравнении с моноклональными антителами (ритуксимаб, блинатумомаб) и ингибиторами тирозинкиназ (ибрутиниб и др.), CAR-T-терапия характеризуется не только высокой частотой ответа на лече-

ние, но и в большей части случаев отсутствием минимальной остаточной болезни (minimal residual disease, MRD). Таким образом, CAR-T-терапия способна эффективно предотвращать рецидивы заболевания. Действительно, опыт клинических исследований последних лет свидетельствует о высокой эффективности CAR-T-терапии при лечении рефрактерных В-клеточных злокачественных новообразований. Самые масштабные клинические исследования, результаты которых позволили получить регистрацию сразу двум препаратам на основе CD19-специфичных CAR-T, показали высокую эффективность в лечении злокачественных новообразований В-клеток (В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, неходжкинских лимфом) – полное выздоровление наблюдалось у 70–90% пациентов с диагнозом рецидивирующий В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ) [28, 29].

ПЕРСПЕКТИВЫ СОВМЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ CAR-T С АНТИТЕЛАМИ ЧЕКПОИНТ-ИНГИБИТОРАМИ

На сегодняшний день хорошо изучены регуляторы Т-клеточной активности – контрольные точки иммунного ответа, также именуемые чек-

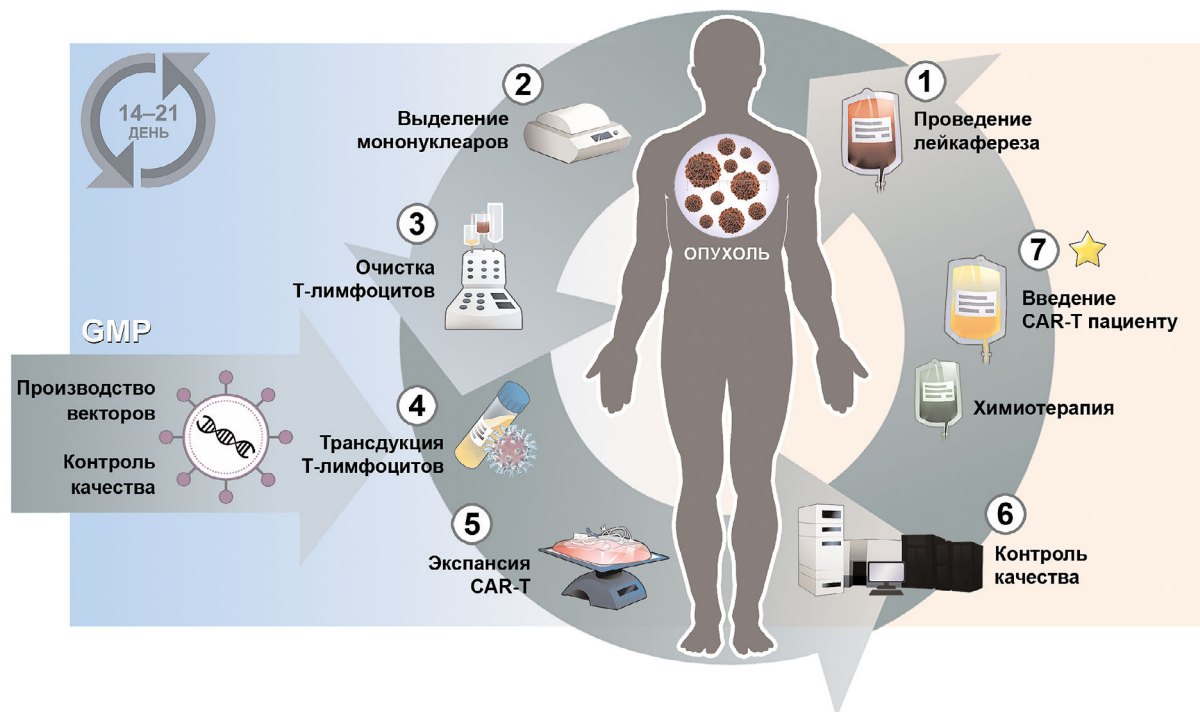


Рис. 4. Цикл производства и применения клеточных препаратов для аутологичной CAR-T-терапии. С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

пойнт-рецепторами: PD-1, LAG-3, CD160, TIM-3 и CTLA-4. Они обуславливают потерю пролиферативной способности Т-лимфоцитов при связывании со своими лигандами и ингибируют продукцию интерлейкина-2 (IL-2), фактора некроза опухоли (TNF) и интерферона гамма (IFN- γ) [30]. PD-L1 является лигандом PD-1, широко экспрессируемым при различных злокачественных новообразованиях (включая плоскоклеточный рак головы и шеи, меланому и рак легких) и позволяющим опухоли избегать иммунного надзора хозяина [31, 32]. Доступные на фармацевтическом рынке блокирующие антитела против PD-1/PD-L1, такие как ниволумаб (Opdivo), пембролизумаб (Keytruda) и атезолизумаб (Tecentriq) уже становятся золотым стандартом иммунотерапии рака при лечении нескольких видов солидных опухолей, в т.ч. меланомы, немелкоклеточного рака легких, почечно-клеточного рака и рака головы и шеи [33]. Интересным примером приложения чекпойнт-блокады может стать хронический лимфолейкоз — злокачественная опухоль с низким уровнем ответа на CAR-T, при которой наблюдается общее подавление активности Т-клеток. Было продемонстрировано, что блокирование PD-L1 на миелоидных супрессионных клетках (MDSCs) из периферической крови пациентов нормализует соотношение лимфоцитов CD4/CD8 и восстанавливает цитотоксичность CD8-Т-лимфоцитов, стимулируя тем самым противоопухолевый иммунный ответ [31].

Компания «Биокад» (Россия) развивает свою линейку антител против ингибирующих и активирующих чекпойнт-рецепторов для комбинированной терапии онкологических заболеваний (рис. 5). Антитело пролголимаб (BCD-100) — антагонист PD-1-рецептора — показало высокую эффективность в клиническом исследовании у пациентов с метастатической меланомой. Пролголимаб был выделен из наивной фаговой дисплейной библиотеки Fab-фрагментов антител человека (MeganLib) и в дальнейшем оптимизирован с применением *in silico* и генно-инженерных методов для достижения необходимых характеристик стабильности и аффинности. Полученный в результате первый оригинальный российский чекпойнт-ингибитор оказался намного стабильнее своих зарубежных конкурентов Opdivo (ниволумаб, «Bristol-Myers Squibb», США) и Keytruda (пембролизумаб; «Merck & Co.», США) благодаря использованию безэффectorной формы IgG1-изотипа, и это позволило начать разработку высококонцентрированной лекарственной формы для подкожного введения (с концентрацией действующего вещества > 100 мг/мл). При этом *in vitro* активность пролголимаба соизмерима с пембролизумабом и выше таковой у ниволумаба. Для сравнительной оценки биологической активности препаратов использовалась эффectorная линия Т-клеточного происхождения, содержащая репортерный ген, кодирующий люциферазу, под контролем NFAT-чувствительного промотора. Взаимодействие PDL1 с PD-1

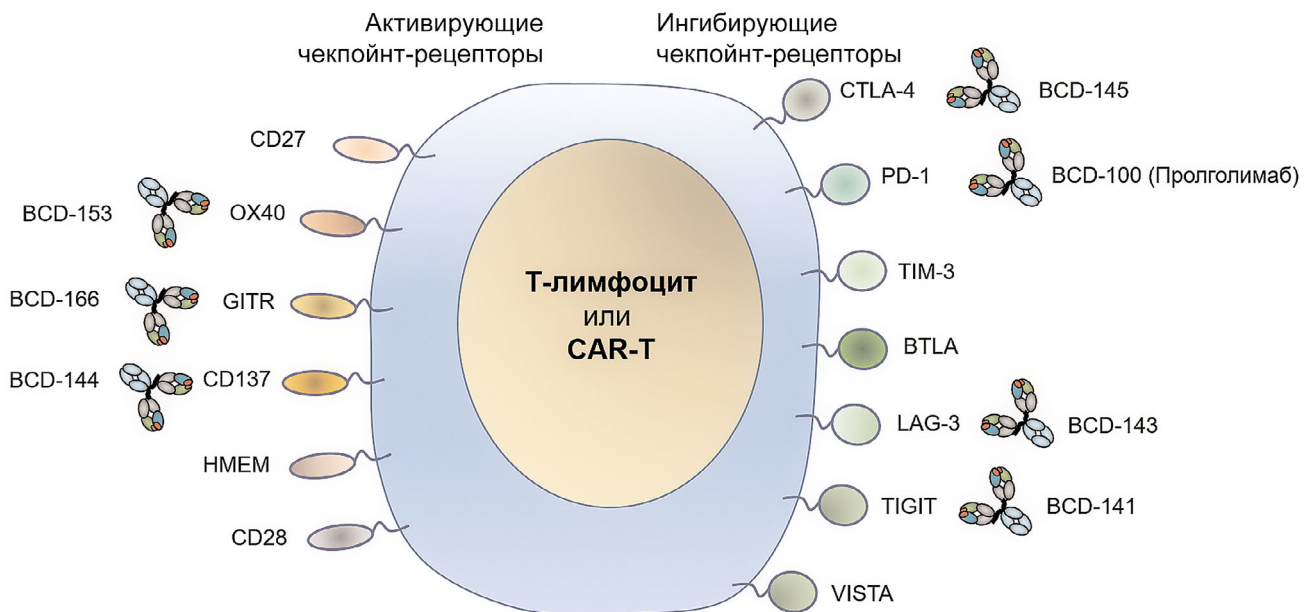


Рис. 5. Рецепторы, контролирующие активность цитотоксических Т-лимфоцитов, и терапевтические антитела (BCD), разрабатываемые в компании «Биокад» (Россия).

С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

эффекторной клеточной линии ингибирует активацию сигнального каскада NFAT. Добавление исследуемых антител препятствует образованию комплекса PD-1/PDL1, что восстанавливает активацию сигнального каскада NFAT (рис. 6).

CAR-T также содержат набор ингибирующих их активность рецепторов типа PD-1, CTLA-4 и LAG-3 и поэтому представляют собой важную группу мишеней для усиления эффективности CAR-T-терапии. По аналогии с наивными Т-лимфоцитами, CAR-T в процессе терминальной дифференцировки приобретают истощенный фенотип, ассоциированный с повышенной экспрессией PD-1 [34]. Показано, что специфичные к мезотелину CAR-T коэкспрессируют PD-1 и LAG-3 или PD-1 и TIM-3 в ортотопической модели мезотелиомы плевры на мышах [35]. В другом исследовании было установлено, что специфичные к мезотелину CAR-T быстро теряли функциональную активность в присутствии опухолевых клеток и начинали активно экспрессировать поверхностные чекпойнт-рецепторы PD-1, LAG-3, TIM-3 и 2B4 одновременно с активацией ингибирующих белков (диацилглицеролкиназа и SHP-1) [36]. При удалении опухолевых клеток-мишеней фенотип CAR-T восстанавливался. Добавление антитела против PD-L1

в значительной степени поддерживало цитотоксичность CAR-T и их способность секретировать IFN- γ . Аналогичный эффект при добавлении анти-PD-1-антитела наблюдался и для GD2-специфичных CAR-T третьего поколения, которые демонстрировали снижение выработки цитокинов после длительного культивирования с клеточными линиями меланомы, экспрессирующими PD-L1 [37].

Сверхэкспрессия чекпойнт-рецепторов CAR-T была также зарегистрирована при анализе клинических образцов. У 8 из 11 пациентов с лимфомой после введения CD19-специфичных клеток CAR-T экспрессия PD-1 на CD4⁺-CAR-T увеличилась как минимум в 3 раза с момента инфузии до выхода на плато по количеству CAR-T в периферической крови [33]. В клиническом исследовании с участием пациентов с В-клеточной лимфомой (рецидив после аллогенной трансплантации стволовых клеток) проводили однократную инфузию аллогенных CD19-специфичных CAR-T. В результате наблюдали увеличение количества CD8⁺- и CD4⁺-CAR-T, экспрессирующих PD-1. Более того, экспрессия PD-1 была выше на CAR⁺-клетках, чем на немоdifцированных Т-лимфоцитах [38]. Аналогичный пример был показан в исследовании, в котором GD2-специфичные CAR-T демонстри-

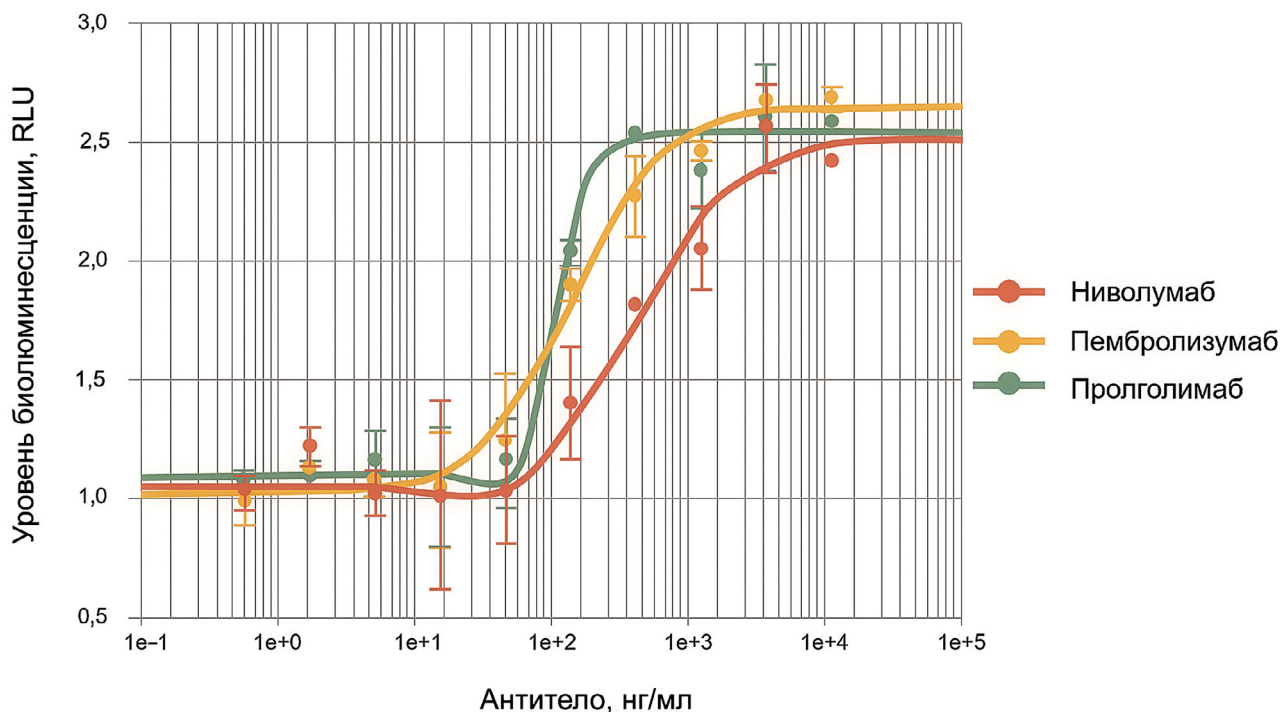


Рис. 6. Сравнительное исследование активности анти-PD1-антител ниволумаба, пембролизумаба и пролголимаба. Результаты клеточного теста на определение анти-PD-1-зависимой реактивации NFAT-сигнального каскада. С цветным вариантом рис. 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

ровали повышение уровня экспрессии PD-1 и снижение срока персистенции у пациентов с метастатической меланомой [37].

КОМБИНАЦИЯ CAR-T-ТЕРАПИИ И БЛОКАДЫ PD-1

Существует несколько подходов, через которые может быть реализовано комбинаторное применение CAR-T и блокады рецептора PD-1. Ген *PD-1* может быть выключен в CAR-T с использованием инструментов редактирования генома. Экспрессия гена *PD-1* временно может быть снижена с помощью введения в клетку коротких шпилечных РНК (shРНК). PD-1 на поверхности клетки может быть заблокирован с помощью терапевтического моноклонального анти-PD-1-антитела, вводимого внутривенно, или одноцепочечного вариабельного фрагмента антитела (scFv), продуцируемого самими CAR-T с экспрессионной кассеты, доставляемой совместно с геном CAR (рис. 7).

Результаты экспериментов *in vivo* показали, что сочетание CAR-T и блокады PD-1 может существенно повысить эффективность противоопухолевой терапии [38]. Введение анти-PD-1-антитела может повысить терапевтическую активность CAR-T-терапии HER2⁺-опухолей в случаях, когда после антиген-специфической стиму-

ляции наблюдается повышение уровня экспрессии PD-1 на HER2-специфичных CAR-T. Добавление анти-PD-1-антитела повышало представленность маркеров активации, увеличивало скорость пролиферации CAR-T, а также значительно усиливало их противоопухолевую активность в моделях на мышах [39]. В другом исследовании было показано, что блокада PD-1/PD-L1 может восстановить эффекторную функцию специфических к мезотелину CAR-T в ортотопической модели мезотелиомы плевры [35]. Важно отметить, что количество анти-PD-1 имеет большое значение для эффективного ингибирования рецептора. Например, при относительно высокой дозировке (250 мкг анти-PD-1 на мыш) PD-1-блокада была способна усилить противоопухолевую активность анти-HER2-специфических CAR-T в сингенной модели рака молочной железы [39], но в более низкой дозировке (125 мкг на мыш) анти-PD-1 не приводило к повышению противоопухолевой активности клеток CAR-T [40]. Эти результаты дают основание полагать, что дальнейшие доклинические и клинические исследования позволят подобрать оптимальную дозировку и режим блокады PD-1 и максимизировать терапевтический эффект от совместного применения с CAR-T.

Альтернативным подходом к совместному использованию CAR-T и блокады чекпойнт-рецепторов может стать вектор, несущий бицист-

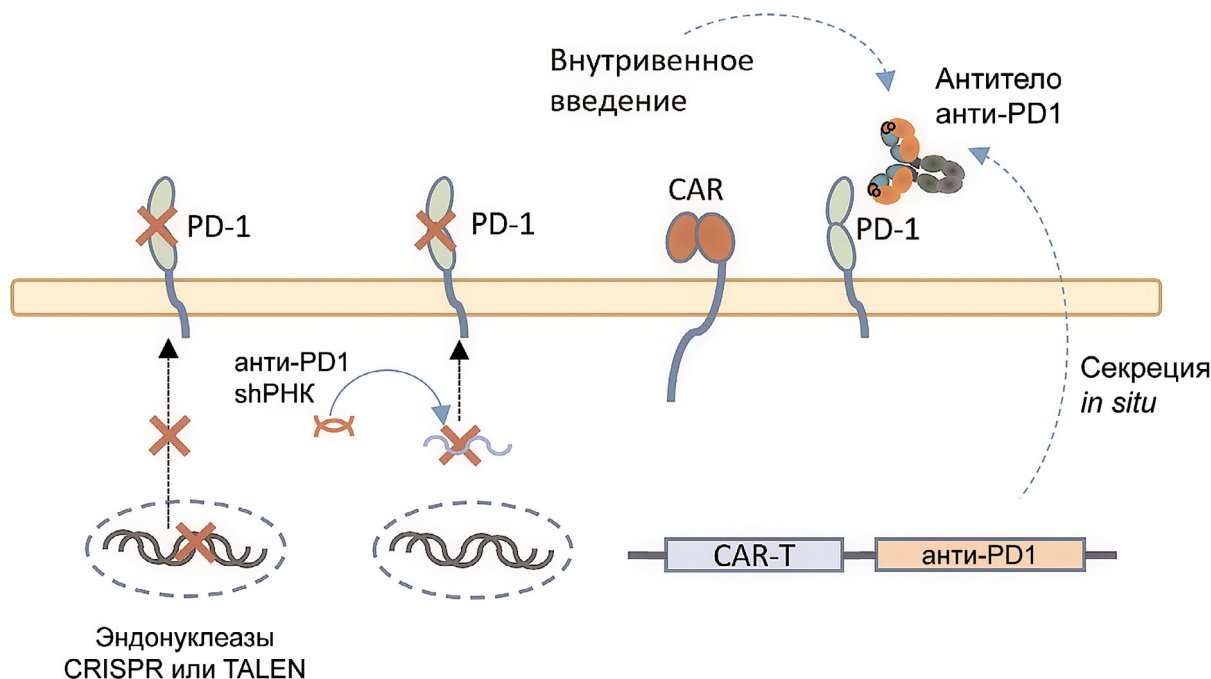


Рис. 7. Стратегии совместного применения CAR-T с чекпойнт-ингибиторами на примере антитела, блокирующего рецептор PD-1.

С цветным вариантом рис. 7 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

ронную генетическую конструкцию. Действительно, существуют данные о том, что CAR-T, коэкспрессирующие фрагмент антитела-антагониста PD-L1 и специфичный к антикарбоангидразе IX (CAIX) CAR, проявляли более высокую противоопухолевую активность. Подобная локальная доставка антител приводила к пятикратному снижению роста опухоли и уменьшению опухоли на 50–80% по сравнению с CAIX-специфичными CAR-T, не секретирующими антитела [41]. В сравнительном исследовании влияния коэкспрессии чекпойнт-ингибитора в CAR-T и введения белкового препарата совместно с CAR-T было показано, что системное введение не приводит к ингибированию роста опухоли у мышей, хотя количество циркулирующих антител, блокирующих PD-1 в этой группе животных, было в 15 раз выше, чем количество, обнаруженное у животных после введения CAR-T, секретирующих анти-PD-1. К тому же такие CAR-T имели более высокий пролиферативный потенциал и функциональный фенотип без признаков истощения [40].

Несмотря на относительно непродолжительный опыт совместного клинического применения CAR-T и различных вариантов блокады чекпойнт-рецепторов и их лигандов, в литературе начинают появляться обнадеживающие данные. Так, например, комбинированная терапия с пембролизумабом при использовании CD19-специфичных CAR-T у детей с диагнозом острый лимфолейкоз приводила к пролонгации сроков персистенции CAR-T в периферической крови и снижению опухолевой нагрузки [42]. Однако есть свидетельства того, что не для всех показаний блокада анти-PD1 может сохранить или восстанавливать противоопухолевую активность CAR-T. Данные клинических исследований GD2-специфичных CAR-T третьего поколения говорят о том, что у пациентов с диагнозом нейробластома, которым вводился пембролизумаб в двух дозах, не наблюдалось различия в эффективности лечения по сравнению с пациентами из других когорт, которые получали монотерапию CAR-T или CAR-T совместно с циклофосфамидом и флударабином [43]. Таким образом, использование блокады PD-1, хотя и является перспективным в сочетании с CAR-T, однако для каждого класса опухолей требует дальнейшего изучения оптимальных доз и режима введения, необходимых для достижения максимального терапевтического ответа. Несмотря на это, широкое клиническое применение уже зарегистрированных иммуноонкологических препаратов на основе антител чекпойнт-ингибиторов в комбинации с CAR-T-терапией в совсем недалеком будущем может стать новой парадиг-

мой в адоптивной клеточной противоопухолевой иммунотерапии.

Еще более эффективным решением для CAR-T-терапии солидных опухолей является комбинаторная иммунотерапия, при которой CAR-T сами способны секретировать фрагмент антитела, блокирующего чекпойнт-рецептор. На сегодняшний день в мире запущено сразу несколько клинических исследований, в которых CAR-T секретируют антитела чекпойнт-ингибиторы (таблица).

ПЕРСПЕКТИВЫ СОВМЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ CAR-T С ЦИТОКИНАМИ

Другим перспективным классом иммуномодулирующих молекул, которые могут существенно расширить горизонты применения CAR-T-терапии, являются цитокины. Это биологически активные вещества пептидной природы с молекулярной массой 8–80 кДа, которые действуют через высокоаффинные, высокоспецифичные рецепторы на поверхности клеток-мишеней. Цитокины регулируют широкий спектр процессов, протекающих в организме, среди которых важнейшими являются модулирование иммунного ответа, стимуляция или подавление роста клеток, гематопоэз и ангиогенез. Различают следующие механизмы действия цитокинов: 1) аутокринный – действие на клетку-продуцент, синтезирующую и секретирующую цитокин; 2) паракринный – действие на клетки, расположенные вблизи клетки-продуцента (например, в очаге воспаления); 3) эндокринный – дистанционное действие на клетки органов и тканей через кровяное русло [44]. Интерлейкины – крайне важные представители класса цитокинов, модулирующие иммунный ответ. Известен ряд сигнальных путей, в которые они вовлечены. Можно выделить несколько ключевых молекулярных механизмов, влияя на которые с помощью интерлейкинов, можно повысить эффективность CAR-T-терапии (рис. 8).

Таким образом, интерлейкины могут быть использованы для усиления противоопухолевых эффектов CAR-T, особенно когда речь идет о терапии солидных опухолей. Для этой цели рассматриваются как системное введение препаратов на основе интерлейкинов совместно с CAR-T, так и конститутивная или индуцибельная коэкспрессия интерлейкинов CAR-T.

Микроокружение многих опухолей не только оказывает выраженный иммуносупрессивный эффект на CAR-T, но и само по себе является физиологически неблагоприятной и малодоступной

Зарегистрированные клинические исследования CAR-T, секретирующих антитела чекпойнт-ингибиторы

Идентификатор Clinicaltrials.gov	Вид CAR-T	Показания	Спонсор исследования
NCT03179007	MUC1-CAR-T, экспрессирующие антитела к CTLA-4 и PD-1	солидные MUC1 ⁺ -опухоли	Shanghai Cell Therapy Research Institute (Китай)
NCT03182816	EGFR-CAR-T, экспрессирующие антитела к CTLA-4 и PD-1	солидные EGFR ⁺ -опухоли	Shanghai Cell Therapy Research Institute (Китай)
NCT03182803	мезотелин-CAR-T, экспрессирующие антитела к CTLA-4 и PD-1	солидные мезотелин ⁺ -опухоли	Shanghai Cell Therapy Research Institute (Китай)
NCT03030001	мезотелин-CAR-T, экспрессирующие антитела к PD-1	солидные мезотелин ⁺ -опухоли	Ningbo Cancer Hospital (Китай)
NCT02873390	EGFR-CAR-T, экспрессирующие антитела к PD-1	солидные EGFR ⁺ -опухоли	Ningbo Cancer Hospital (Китай)
NCT02862028	EGFR-CAR-T, экспрессирующие антитела к PD-1	EGFR ⁺ -опухоли легкого, печени и желудка	Shanghai International Medical Center (Китай)
NCT03170141	иммуноген-модифицированные Т-клетки (IgT)	мультиформная EGFRvIII ⁺ -глиобластома	Shenzhen Geno-Immune Medical Institute (Китай)
NCT03298828	CD19-CAR-T с нокаутом гена <i>PD-1</i>	острый лимфобластный CD19 ⁺ -лейкоз и лимфома Беркитта	Third Military Medical University (Китай)
NCT03208556	CD19-CAR-T, экспрессирующие shPHK к PD-1	CD19 ⁺ -рецидивирующая или устойчивая к терапии В-клеточная лимфома	Peking University (Китай)

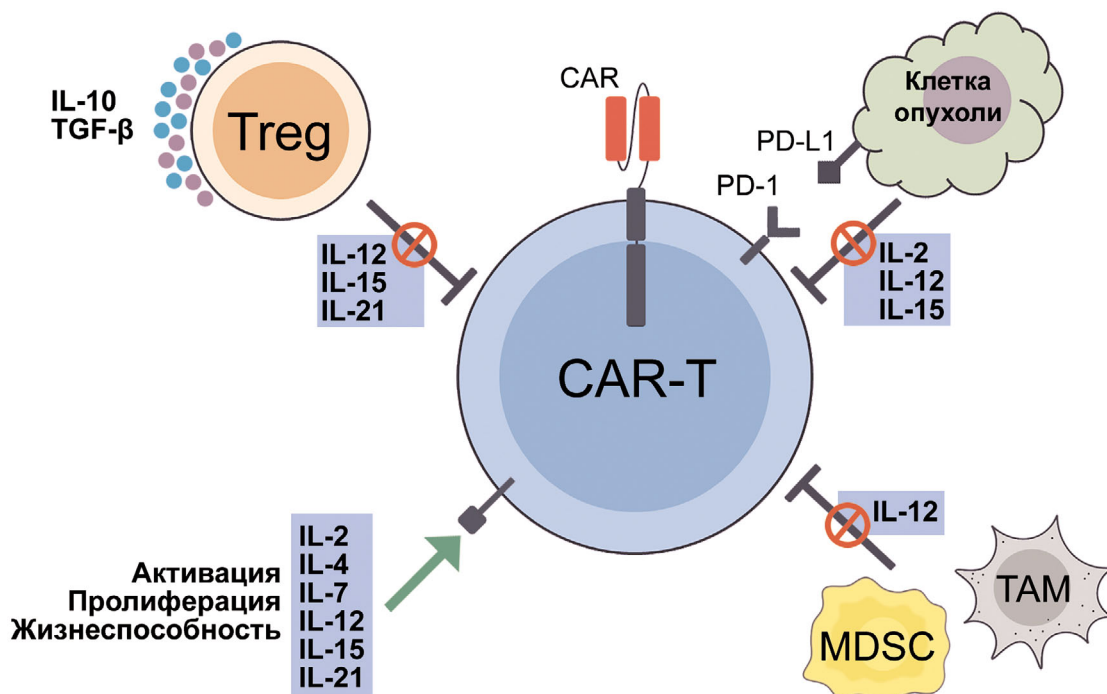


Рис. 8. Основные механизмы преодоления иммуносупрессивного воздействия микроокружения опухоли на CAR-T при помощи цитокинов.

С цветным вариантом рис. 8 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

для инфильтрации иммунных клеток нишей. Это происходит из-за гипоксии, низкого содержания питательных веществ и высокой концентрации метаболитов, которые ингибируют способность Т-лимфоцитов пролиферировать и вырабатывать провоспалительные цитокины [45]. При этом ряд исследований свидетельствует о пролонгированной *in vivo* персистенции CAR-T, коэкспрессирующих цитокины, и их способности в значительной степени подавлять иммуносупрессивное микроокружение, которое характерно для солидных опухолей [5]. Однако не стоит забывать, что использование цитокинов сопряжено с риском возникновения побочных эффектов при повышении их системного уровня [46]. По-прежнему нет единого представления о том, какой из цитокинов является наиболее эффективным. Это справедливо в отношении возможных способов комбинированного применения совместно с CAR-T. Несмотря на принципиальную схожесть функций ряда провоспалительных цитокинов для иммунной системы в целом, выраженность их влияния на механизмы регуляции наивных и генетически модифицированных Т-лимфоцитов существенно отличается.

ИНТЕРЛЕЙКИН-2

Интерлейкин-2 (IL-2) является наиболее изученным цитокином. Он представляет собой белок массой 15,5 кДа. Изначально IL-2 был описан как «фактор роста Т-клеток». Позднее было показано, что он также оказывает стимуляторное воздействие на натуральные киллеры и В-лимфоциты. IL-2 продуцируется антиген-активированными CD4⁺-Т-лимфоцитами, CD8⁺-Т-лимфоцитами, NK и дендритными клетками. Он стимулирует клетки-мишени, которые экспрессируют на своей поверхности высокоаффинный тример рецептора IL-2 (rIL-2), состоящего из α -, β - и γ -цепей, и низкоаффинный димер rIL-2, состоящего из β - и γ -цепей [47, 48]. IL-2 играет важную роль в регуляции пролиферативной активности и клональной экспансии Т-лимфоцитов и натуральных киллеров. IL-2-зависимая активация Т-клеток происходит при наличии костимуляции CD28 [49], такая комбинация сигналинга приводит к усилению пролиферативной активности Т-лимфоцитов и активации антиапоптотического фактора Bcl-2 [50].

IL-2 играет важную роль в современной CAR-T-терапии, поскольку используется для поддержания жизнеспособности и эффективной экспансии CAR-T в процессе производства уже зарегистрированных продуктов CAR-T, доступных на рынке [24]. В связи с этим большой

интерес представляют недавно полученные данные о том, что длительное культивирование CD19-специфичных CAR-T в присутствии IL-2 негативно сказывается на их противоопухолевой активности при тестировании на модели острого лимфобластного лейкоза *in vivo*, при этом краткосрочное культивирование положительно влияет на соотношение эффекторных клеток и клеток памяти в популяции CAR-T [51]. Таким образом, востребованность исследований, которые помогут повысить продуктивность процесса производства CAR-T, по-прежнему очевидна.

В свою очередь, изучение влияния комбинированного применения IL-2 и CAR-T началось задолго до прорывного успеха CD19-специфичной CAR-T-терапии в онкогематологии. Ранний клинический опыт показывал, что CAR-T первого поколения требовали дополнительного системного введения IL-2 для достижения оптимального ответа пациента на терапию [52]. Позднее было установлено, что CAR-T погибали в течение шести дней при отсутствии IL-2 [53]. Такой срок является недостаточным для элиминации опухоли, что обуславливало необходимость введения экзогенного IL-2 для повышения эффективности CAR-T-терапии. По мере изучения молекулярных механизмов действия CAR-T появлялись новые данные о роли IL-2. На примере SEA-специфичных CAR-T второго поколения было установлено, что они секретировали значительно больше IL-2 и IFN- γ по сравнению с CAR-T первого поколения. Это обуславливало более длительную персистенцию и выраженный противоопухолевый эффект на модели метастатической меланомы *in vivo* [54]. Аналогичный эффект наблюдался для HER-2-специфичных CAR-T – они проявляли противоопухолевую активность на модели меланомы только в трансгенной линии мышей, экспрессирующих IL-2 человека [55].

Аспекты применения комбинации CAR-T совместно с IL-2 в клинике остаются недостаточно изученными. Судя по опубликованным данным клинических исследований, при введении низких доз рекомбинантного IL-2 совместно с биспецифичными CD20/CD19-CAR-T выраженной токсичности не наблюдалось [56]. В то же время низкие дозы IL-2 не влияли на эффективность CAR-T, таргетирующих простат-специфический мембранный антиген (PSMA) у пациентов с раком простаты [57]. При этом в литературе были описаны эпизоды тяжелых побочных явлений, ассоциированных с введением больших доз IL-2 пациентам с раком яичников на фоне применения CAR-T, специфичных к фолатному рецептору (FR) [10].

ИНТЕРЛЕЙКИН-4

Интерлейкин-4 (IL-4) является членом семейства цитокинов IL-2, который выполняет фундаментальную функцию в развитии и гомеостазе иммунной системы. По этой причине его уже пробовали использовать для повышения терапевтического потенциала иммунотерапии рака на основе CAR-T. Экспериментально подтверждено, что CAR-T, специфичные к муцину 1 (MUC1) и экспрессирующие химерный цитокиновый рецептор $4\alpha\beta$, при культивировании в присутствии IL-4 увеличивали скорость пролиферации и приобретали более выраженную цитотоксическую активность по отношению к MUC1⁺-клеткам-мишеням [58]. Другая группа ученых продвинулась в исследованиях значительно дальше и разработала ErbB-специфичные CAR-T, экспрессирующие рецептор $4\alpha\beta$, для лечения рака головы и шеи. Концепция использования такой CAR-T-терапии, получившей название T4 иммунотерапии, заключается в локальном введении CAR-T для минимизации рисков неспецифической токсичности, которая обусловлена фоновой экспрессией ErbB на клетках ряда здоровых тканей организма [59]. Первая фаза клинических исследований T4 иммунотерапии (NCT01818323, www.clinicaltrials.gov) началась в 2015 г., однако результаты пока не опубликованы.

ИНТЕРЛЕЙКИН-7

Интерлейкин (IL-7) играет важную роль в поддержании гомеостаза и физиологического соотношения CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов через рецептор IL-7, экспрессированный на CD8⁺-клетках [60]. Многочисленные исследования подтверждают, что совместное использование CAR-T с IL-7 и IL-15 приводит к более выраженной активации, увеличению скорости пролиферации и стимуляции противоопухолевой активности [61–63]. Молекулярный механизм в основе наблюдаемого эффекта представляет большой интерес. Было установлено, что CD19-специфичные CAR-T, коэкспрессирующие IL-7, лучше переносили многократную стимуляцию антигеном *in vitro*, однако не отличались от контроля по продолжительности персистенции *in vivo* [64]. По всей видимости, конститутивная экспрессия IL-7 со временем приводила к истощению рецептора IL-7 на поверхности CD8⁺-клеток. Действительно, экспрессия экзогенной α -субъединицы рецептора IL-7 (IL-7R α) на GD2-специфичных эффекторных CAR-T приводила к повышению жизнеспособности,

увеличению скорости пролиферации и усилению их эффекторной функции на модели нейробластомы [65]. Этот факт не исключает возможной пользы от применения IL-7 в составе коктейля цитокинов при производстве CAR-T, однако делает его менее предпочтительным кандидатом для создания комбинации CAR-T и IL-7 для дальнейшего терапевтического применения.

ИНТЕРЛЕЙКИН-12

Интерлейкин-12 (IL-12) является провоспалительным цитокином, который в норме секретируется фагоцитами и дендритными клетками [66]. Показано, что IL-12 вовлечен в регуляцию как врожденного, так и адаптивного иммунитета [67, 68], ингибирует эндотелиальные клетки и обладает выраженным антиангиогенным эффектом [69], а также, по некоторым данным, проявляет антиметастатическую активность [70]. Безусловно, способность IL-12 к мобилизации иммунных клеток против опухоли является одним из наиболее важных его свойств. IL-12 стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов и натуральных киллеров [71, 72], а также способствует сохранению популяции CD4⁺-клеток памяти [44]. Обратной стороной многочисленных проявлений биологической активности IL-12 является чувствительность организма к повышению его концентрации в плазме крови. Действительно, в ходе проведения клинических исследований при внутривенном введении IL-12 был зарегистрирован выраженный токсический эффект, ассоциированный с резким повышением уровня IFN- γ [73].

Очевидно, что альтернативой системному введению IL-12, которое приводит к возникновению побочных эффектов, является локальная доставка. Ранние опыты по введению плазмидной ДНК, кодирующей ген *IL-12*, в очаг опухоли позволили получить некоторый положительный клинический результат у пациентов с метастатической меланомой [74].

ИНТЕРЛЕЙКИН-15

Интерлейкин-15 (IL-15) был впервые идентифицирован как цитокин, обладающий митогенной активностью по отношению к Т-лимфоцитам и натуральным киллерам [75, 76]. Он является членом семейства цитокинов IL-2 и продуцируется моноцитами, дендритными клетками, макрофагами и клетками стромы [77]. По аналогии с IL-2, IL-15 стимулирует пролиферативную активность, повышает жизнеспособ-

ность и влияет на эффекторные функции натуральных киллеров и Т-лимфоцитов. Однако IL-15, в отличие от IL-2, не вызывает индуцированную активацией гибель эффекторных CD8⁺-клеток и не активирует пролиферацию регуляторных Т-лимфоцитов [78]. Это делает его более привлекательной альтернативой IL-2 для использования в адаптивной Т-клеточной иммунотерапии [79], в т.ч. в процессе производства CAR-T [61]. В литературе описан метод эффективной экспансии CD19-специфичных CAR-T, полученных из Т-лимфоцитов здоровых доноров и пациентов с лейкозами и В-клеточными лимфомами, в присутствии экзогенного IL-15 [80]. Имеются данные о том, что CAR-T, культивируемые в присутствии IL-15, проявляют более выраженную цитолитическую активность *in vitro* [81]. Доставка хемокина, экспрессируемого и секретлируемого Т-клетками при активации (RANTES), и IL-15 с помощью онколитического аденовируса Ad5D24 поддерживала продолжительную персистенцию *in vivo* GD2-специфических CAR-T и повышала выживаемость экспериментальных животных [82]. Вероятно, усиление противоопухолевых свойств CAR-T, экспрессирующих IL-15, обусловлено активацией антиапоптотического белка Mcl-1, стимулирующего экспрессию Bcl-2 [83].

По данным сайта www.clinicaltrials.gov, на территории Китая зарегистрировано два клинических исследования (NCT02992834, NCT02652910), в которых предполагается оценить эффективность лечения лейкозов и В-клеточных лимфом с помощью CD19-специфических CAR-T, полученных с использованием коктейля IL-7/IL-15. Упоминаний о других аналогичных клинических исследованиях нами обнаружено не было. Таким образом, данные о безопасности и эффективности использования IL-15 в комбинации с CAR-T в клинике в настоящее время не опубликованы. Тем не менее IL-15 можно рассматривать как альтернативу IL-2 в процессе производства CAR-T *ex vivo*.

ИНТЕРЛЕЙКИН-21

Интерлейкин-21 (IL-21) продуцируется в основном Т-лимфоцитами и оказывает влияние на врожденный и приобретенный иммунитет. Он не только играет важную роль в противоопухолевых и противовирусных реакциях организма, но также оказывает значительное влияние на процесс воспаления, в т.ч. при аутоиммунных заболеваниях [84]. Важно отметить, что IL-21, в отличие от IL-2, стимулирует генерацию CD8⁺-Т-лимфоцитов, что сопровождается уменьшением количества регуляторных

Fox3⁺-клеток [85]. По некоторым данным, добавление коктейля из IL-7, IL-15 и IL-21 при культивировании Т-лимфоцитов приводило к генерации стволовых клеток памяти [86]. На мышцах с сингенной моделью тимомы показано, что IL-21, как и IL-15, не вызывает активационного апоптоза Т-лимфоцитов и обладает защитным эффектом, продлевающим персистенцию CD8⁺-клеток [87]. Рекомбинантный IL-21 уже применяется в клинических исследованиях для лечения пациентов со злокачественной почечно-клеточной карциномой, меланомой и неходжкинской лимфомой и продемонстрировал приемлемый профиль безопасности и относительную эффективность в качестве монотерапии [88].

С точки зрения процесса получения CAR-T, IL-21 может быть полезен для увеличения скорости пролиферации цитотоксических клеток и повышения их жизнеспособности. Стимуляция IL-21-зависимого сигналинга через сокультивирование CAR-T с клетками-мишенями в присутствии IL-21 или экспрессирующими на своей поверхности химерный IL-21 приводила к повышению противоопухолевой активности CD19-специфичных CAR-T на модели острого лимфолейкоза *in vivo* [89]. Суммируя приведенные выше данные, можно сделать вывод о том, что IL-21 сам по себе или в составе коктейля цитокинов может повысить продуктивность процесса получения CAR-T *ex vivo*. Возможность его совместного применения с CAR-T-терапией представляет интерес и требует дальнейшего изучения.

После громкого успеха адаптивной иммунотерапии на основе CAR-T в лечении гематологических злокачественных новообразований многие исследователи включились в работу по созданию более совершенных CAR-T с целью повышения их эффективности и расширения списка заболеваний, поддающихся лечению с помощью данного вида терапии. Не подлежит сомнению, что следующим этапом в развитии CAR-T должно стать появление по-настоящему эффективной терапии солидных опухолей. Для этого ученым предстоит не только решить ряд технологических задач в рамках создания платформы для получения более доступных CAR-T-препаратов, но и найти способы повышения противоопухолевой активности данного вида терапии. Иммуноонкологические препараты на основе антител чекпойнт-ингибиторов могут существенно увеличить эффективность CAR-T-терапии, в то время как цитокины и их коктейли – повысить продуктивность процесса производства клеточных препаратов на основе CAR-T.

Уже в ближайшем будущем, по мере завершения клинических исследований CAR-T-терапии нового поколения, будет сформировано более полное понимание положительных эффектов от использования комбинаций CAR-T с чекпойнт-ингибиторами и цитокинами в терапии как гематологических, так и солидных опухолей.

Финансирование. Работа выполнена на собственные средства компании «Биокад» (Россия).

Конфликт интересов. Авторы статьи являются сотрудниками компании «Биокад» (Россия).

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gross, G., Waks, T., and Eshhar, Z. (1989) Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 10024–10028.
- Fesnak, A.D., June, C.H., and Levine, B.L. (2016) Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy, *Nat. Rev. Cancer*, **16**, 566–581, doi: 10.1038/nrc.2016.97.
- Li, J., Li, W., Huang, K., Zhang, Y., Kupfer, G., and Zhao, Q. (2018) Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) immunotherapy for solid tumors: lessons learned and strategies for moving forward, *J. Hematol. Oncol.*, **11**, 22, doi: 10.1186/s13045-018-0568-6.
- Domschke, C., Schneeweiss, A., Stefanovic, S., Wallwiener, M., Heil, J., Rom, J., Sohn, C., and Schuetz, F. (2016) Cellular immune responses and immune escape mechanisms in breast cancer: determinants of immunotherapy, *Breast Care*, **11**, 102–107.
- Knochelmann, H.M., Smith, A.S., Dwyer, C.J., Wyatt, M.M., Mehrotra, S., and Paulos, C.M. (2018) CAR T cells in solid tumors: blueprints for building effective therapies, *Front. Immunol.*, **9**, 1–20, doi: 10.3389/fimmu.2018.01740.
- Barrett, D.M., Singh, N., Porter, D.L., Grupp, S.A., and June, C.H. (2014) Chimeric antigen receptor therapy for cancer, *Annu. Rev. Med.*, **65**, 333–347, doi: 10.1146/annurev-med-060512-150254.
- Sadelain, M., Brentjens, R., and Riviere, I. (2013) The basic principles of chimeric antigen receptor design, *Cancer Discov.*, **3**, 388–398, doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0548.
- Srivastava, S., and Riddell, S.R. (2015) Engineering CAR-T cells: design concepts, *Trends Immunol.*, **36**, 494–502, doi: 10.1016/j.it.2015.06.004.
- Gong, M.C., Latouche, J.B., Krause, A., Heston, W.D., Bander, N.H., and Sadelain, M. (1999) 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*, **1**, 123–127, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2013.02.024.
- Kershaw, M.H., Westwood, J.A., Parker, L.L., Wang, G., Eshhar, Z., Mavroukakis, S.A., White, D.E., Wunderlich, J.R., Canevari, S., Rogers-Freezer, L., Chen, C.C., Yang, J.C., Rosenberg, S.A., and Hwu, P. (2006) A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer, *Clin. Cancer Res.*, **12**, 6106–6115, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1183.
- Lamers, C.H.J., Sleijfer, S., Vulto, A.G., Kruit, W.H.J., Kliffen, M., Debets, R., Gratama, J.W., Stoter, G., and Oosterwijk, E. (2006) Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience, *J. Clin. Oncol.*, **24**, 20–22, doi: 10.1200/JCO.2006.05.9964.
- Kowolik, C.M., Topp, M.S., Gonzalez, S., Pfeiffer, T., Olivares, S., Gonzalez, N., Smith, D.D., Forman, S.J., Jensen, M.C., and Cooper, L.J.N. (2006) CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T Cells, *Cancer Res.*, **66**, 10995–11004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0160.
- Brentjens, R.J., Santos, E., Nikhamin, Y., Yeh, R., Matsushita, M., La Perle, K., Quintas-Cardama, A., Larson, S.M., and Sadelain, M. (2007) Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts, *Clin. Cancer Res.*, **13**, 5426–5435, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0674.
- Milone, M.C., Fish, J.D., Carpenito, C., Carroll, R.G., Binder, G.K., Teachey, D., Samanta, M., Lakhai, M., Gloss, B., Danet-Desnoyers, G., Campana, D., Riley, J.L., Grupp, S.A., and June, C.H. (2009) Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy *in vivo*, *Mol. Ther.*, **17**, 1453–1464, doi: 10.1038/mt.2009.83.
- Chang, Z.L., and Chen, Y.Y. (2017) CARs: synthetic immunoreceptors for cancer therapy and beyond, *Trends Mol. Med.*, **23**, 430–450, doi: 10.1016/j.molmed.2017.03.002.
- Sadelain, M. (2016) Chimeric antigen receptors: driving immunology towards synthetic biology, *Curr. Opin. Immunol.*, **41**, 68–76, doi: 10.1016/j.coi.2016.06.004.
- Bridgeman, J.S., Ladell, K., Sheard, V.E., Miners, K., Hawkins, R.E., Price, D.A., and Gilham, D.E. (2014) CD3 ζ -based chimeric antigen receptors mediate T cell activation via *cis*- and *trans*-signalling mechanisms: implications for optimization of receptor structure for adoptive cell therapy, *Clin. Exp. Immunol.*, **175**, 258–267, doi: 10.1111/cei.12216.
- Brentjens, R.J., Latouche, J.-B., Santos, E., Marti, F., Gong, M.C., Lyddane, C., King, P.D., Larson, S., Weiss, M., Riviere, I., and Sadelain, M. (2003) Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15, *Nat. Med.*, **9**, 279–286, doi: 10.1038/nm827.
- Schambach, A., and Morgan, M. (2016) Retroviral vectors for cancer gene therapy, in *Current strategies in cancer gene therapy. Recent results in cancer research* (Walther, W., ed.), **209**, 17–35, Springer, Cham, doi: 10.1007/978-3-319-42934-2_2.
- Scholler, J., Brady, T.L., Binder-Scholl, G., Hwang, W.T., Plesa, G., Hege, K.M., Vogel, A.N., Kalos, M., Riley, J.L., Deeks, S.G., Mitsuyasu, R.T., Bernstein, W.B., Aronson, N.E., Levine, B.L., Bushman, F.D., and June, C.H. (2012) Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells, *Sci. Transl. Med.*, **4**, 132ra53, doi: 10.1126/scitranslmed.3003761.
- Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G.P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L.,

- Delabesse, E., Beldjord, K., Asnafi, V., MacIntyre, E., Dal Cortivo, L., Radford, I., Brousse, N., Sigaux, F., Moshous, D., Hauer, J., Borkhardt, A., Belohradsky, B.H., Wintergerst, U., Vélez, M. C., Leiva, L., Sorensen, R., Wulfraat, N., Blanche, S., Bushman, F.D., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2008) Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1, *J. Clin. Invest.*, **118**, 3132–3142, doi: 10.1172/JCI35700.
22. Brady, T., and Bushman, F.D. (2011) Nondividing cells: a safer bet for integrating vectors? *Mol. Ther.*, **19**, 640–641, doi: 10.1038/mt.2011.40.
 23. Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996) *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector, *Science*, **272**, 263–267, doi: 10.1126/science.272.5259.263.
 24. Levine, B.L., Miskin, J., Wonnacott, K., and Keir, C. (2017) Global manufacturing of CAR T cell therapy, *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, **4**, 92–101, doi: 10.1016/j.omtm.2016.12.006.
 25. Kebriaei, P., Singh, H., Huls, M.H., Figliola, M.J., Bassett, R., Olivares, S., Jena, B., Dawson, M.J., Kumaresan, P.R., Su, S., Maiti, S., Dai, J., Moriarity, B., Forget, M.-A., Senyukov, V., Orozco, A., Liu, T., McCarty, J., Jackson, R.N., Moyes, J.S., Rondon, G., Qazilbash, M., Ciurea, S., Alousi, A., Nieto, Y., Rezvani, K., Marin, D., Popat, U., Hosing, C., Shpall, E.J., Kantarjian, H., Keating, M., Wierda, W., Do, K.A., Largaespada, D.A., Lee, D.A., Hackett, P.B., Champlin, R.E., and Cooper, L.J.N. (2016) Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells, *J. Clin. Invest.*, **126**, 3363–3376, doi: 10.1172/JCI86721.
 26. Hackett, P.B., Aronovich, E.L., Hunter, D., Urness, M., Bell, J.B., Kass, S.J., Cooper, L.J.N., and McIvor, S. (2011) Efficacy and safety of Sleeping Beauty transposon-mediated gene transfer in preclinical animal studies, *Curr. Gene Ther.*, **11**, 341–349, doi: 10.2174/156652311797415827.
 27. Monjezi, R., Miskey, C., Gogishvili, T., Schleef, M., Schmeer, M., Einsele, H., Ivics, Z., and Hudecek, M. (2017) Enhanced CAR T-cell engineering using non-viral Sleeping Beauty transposition from minicircle vectors, *Leukemia*, **31**, 186–194, doi: 10.1038/leu.2016.180.
 28. Maude, S.L. (2014) Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia, *N. Engl. J. Med.*, **371**, 1507–1517, doi: 10.1056/NEJMoa1407222.
 29. Zhao, Z., Chen, Y., Francisco, N.M., Zhang, Y., and Wu, M. (2018) The application of CAR-T cell therapy in hematological malignancies: advantages and challenges, *Acta Pharm. Sin. B*, **8**, 539–551, doi: 10.1016/j.apsb.2018.03.001.
 30. Wherry, E.J. (2011) T cell exhaustion, *Nat. Immunol.*, **12**, 492–499.
 31. McClanahan, F., Hanna, B., Miller, S., Clear, A.J., Lichter, P., Gribben, J.G., and Seiffert, M. (2015) PD-L1 checkpoint blockade prevents immune dysfunction and leukemia development in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia, *Blood*, **126**, 203–211, doi: 10.1182/blood-2015-01-622936.
 32. Iwai, Y., Hamanishi, J., Chamoto, K., and Honjo, T. (2017) Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway, *J. Biomed. Sci.*, **24**, 26, doi: 10.1186/s12929-017-0329-9.
 33. Park, Y.-J., Kuen, D.-S., and Chung, Y. (2018) Future prospects of immune checkpoint blockade in cancer: from response prediction to overcoming resistance, *Exp. Mol. Med.*, **50**, 109, doi: 10.1038/s12276-018-0130-1.
 34. Kochenderfer, J.N., Dudley, M.E., Kassim, S.H., Somerville, R.P.T., Carpenter, R.O., Stetler-Stevenson, M., Yang, J.C., Phan, G.Q., Hughes, M.S., Sherry, R.M., Raffeld, M., Feldman, S., Lu, L., Li, Y.F., Ngo, L.T., Goy, A., Feldman, T., Spaner, D.E., Wang, M.L., Chen, C.C., Kranick, S.M., Nath, A., Nathan, D.-A.N., Morton, K.E., Toomey, M.A., and Rosenberg, S.A. (2015) 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.*, **33**, 540–549, doi: 10.1200/JCO.2014.56.2025.
 35. Cherkassky, L., Morello, A., Villena-Vargas, J., Feng, Y., Dimitrov, D.S., Jones, D.R., Sadelain, M., and Adusumilli, P.S. (2016) Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition, *J. Clin. Invest.*, **126**, 3130–3144, doi: 10.1172/JCI83092.
 36. Moon, E.K., Wang, L.-C., Dolfi, D.V., Wilson, C.B., Ranganathan, R., Sun, J., Kapoor, V., Scholler, J., Pure, E., Milone, M.C., June, C.H., Riley, J.L., Wherry, E.J., and Albelda, S.M. (2014) Multifactorial T-cell hypofunction that is reversible can limit the efficacy of chimeric antigen receptor-transduced human T cells in solid tumors, *Clin. Cancer Res.*, **20**, 4262–73, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2627.
 37. Gargett, T., Yu, W., Dotti, G., Yvon, E.S., Christo, S.N., Hayball, J.D., Lewis, I.D., Brenner, M.K., and Brown, M.P. (2016) GD2-specific CAR T cells undergo potent activation and deletion following antigen encounter but can be protected from activation-induced cell death by PD-1 blockade, *Mol. Ther.*, **24**, 1135–1149, doi: 10.1038/mt.2016.63.
 38. Brudno, J.N., Somerville, R.P.T., Shi, V., Rose, J.J., Halverson, D.C., Fowler, D.H., Gea-Banacloche, J.C., Pavletic, S.Z., Hickstein, D.D., Lu, T.L., Feldman, S.A., Iwamoto, A.T., Kurlander, R., Maric, I., Goy, A., Hansen, B.G., Wilder, J.S., Blacklock-Schuver, B., Hakim, F.T., Rosenberg, S.A., Gress, R.E., and Kochenderfer, J.N. (2016) Allogeneic T cells that express an anti-CD19 chimeric antigen receptor induce remissions of B-cell malignancies that progress after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation without causing graft-versus-host disease, *J. Clin. Oncol.*, **34**, 1112–1121, doi: 10.1200/JCO.2015.64.5929.
 39. John, L.B., Devaud, C., Duong, C.P.M., Yong, C.S., Beavis, P.A., Haynes, N.M., Chow, M.T., Smyth, M.J., Kershaw, M.H., and Darcy, P.K. (2013) Anti-PD-1 antibody therapy potentially enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells, *Clin. Cancer Res.*, **19**, 5636–5646, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0458.
 40. Li, S., Siriwon, N., Zhang, X., Yang, S., Jin, T., He, F., Kim, Y.J., Mac, J., Lu, Z., Wang, S., Han, X., and Wang, P. (2017) Enhanced cancer immunotherapy by chimeric antigen receptor-modified T cells engineered to secrete checkpoint inhibitors, *Clin. Cancer Res.*, **23**, 6982–6992, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0867.
 41. Suarez, E.R., Chang, D.K., Sun, J., Sui, J., Freeman, G.J., Signoretti, S., Zhu, Q., and Marasco, W.A. (2016) Chimeric antigen receptor T cells secreting anti-PD-L1 antibodies more effectively regress renal cell carcinoma in a humanized mouse model, *Oncotarget*, **7**, 34341–34355, doi: 10.18632/oncotarget.9114.
 42. Maude, S.L., Hucks, G.E., Seif, A.E., Talekar, M.K., Teachey, D.T., Baniewicz, D., Callahan, C., Gonzalez, V., Nazimuddin, F., Gupta, M., Frey, N.V., Porter, D.L., Levine, B.L., Melenhorst, J.J., Lacey, S.F., June, C.H., and Grupp, S.A. (2017) The effect of pembrolizumab in combination with CD19-targeted chimeric antigen receptor (CAR) T cells in relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL), *J. Clin. Oncol.*, **35**, 103–103, doi: 10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.103.
 43. Heczey, A., Louis, C.U., Savoldo, B., Dakhova, O., Durett, A., Grilley, B., Liu, H., Wu, M.F., Mei, Z., Gee, A., Mehta, B., Zhang, H., Mahmood, N., Tashiro, H.,

- Heslop, H.E., Dotti, G., Rooney, C.M., and Brenner, M.K. (2017) CAR T cells administered in combination with lymphodepletion and PD-1 inhibition to patients with neuroblastoma, *Mol. Ther.*, **25**, 2214–2224, doi: 10.1016/j.ymthe.2017.05.012.
44. Anastakis, D., Petanidis, S., Kalyvas, S., Nday, C.M., Tsave, O., Kioseoglou, E., and Salifoglou, A. (2015) Mechanisms and applications of interleukins in cancer immunotherapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 1691–1710, doi: 10.3390/ijms16011691.
 45. Belli, C., Trapani, D., Viale, G., D'Amico, P., Duso, B.A., Della Vigna, P., Orsi, F., and Curigliano, G. (2018) Targeting the microenvironment in solid tumors, *Cancer Treat. Rev.*, **65**, 22–32, doi: 10.1016/j.ctrv.2018.02.004.
 46. Liu, D., and Zhao, J. (2018) Cytokine release syndrome: grading, modeling, and new therapy, *J. Hematol. Oncol.*, **11**, 121, doi: 10.1186/s13045-018-0653-x.
 47. Sim, G.C., and Radvanyi, L. (2014) The IL-2 cytokine family in cancer immunotherapy, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **25**, 377–390, doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.07.018.
 48. Ahmadzadeh, M. (2006) IL-2 administration increases CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer patients, *Blood*, **107**, 2409–2414, doi: 10.1182/blood-2005-06-2399.
 49. Appleman, L.J., Berezovskaya, A., Grass, I., and Boussiotis, V.A. (2000) CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression, *J. Immunol.*, **164**, 144–151, doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.1.144>.
 50. Mor, F., and Cohen, I.R. (1996) IL-2 rescues antigen-specific T cells from radiation or dexamethasone-induced apoptosis. Correlation with induction of Bcl-2, *J. Immunol.*, **156**, 515–522.
 51. Zhang, X., Lv, X., and Song, Y. (2018) Short-term culture with IL-2 is beneficial for potent memory chimeric antigen receptor T cell production, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **495**, 1833–1838, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.041.
 52. Brocker, T. (2000) Chimeric Fv- ζ or Fv- ϵ receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells, *Blood*, **96**, 1999–2001.
 53. Emtage, P.C., Lo, A.S., Gomes, E.M., Liu, D.L., Gonzalo-Daganzo, R.M., and Junghans, R.P. (2008) Second-generation anti-carcinoembryonic antigen designer T cells resist activation-induced cell death, proliferate on tumor contact, secrete cytokines, and exhibit superior antitumor activity *in vivo*: a preclinical evaluation, *Clin. Cancer Res.*, **14**, 8112–8122, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4910.
 54. Lo, A.S., Ma, Q., Liu, D.L., and Junghans, R.P. (2010) Anti-GD3 chimeric sFv-CD28/T-cell receptor ζ designer T cells for treatment of metastatic melanoma and other neuroectodermal tumors, *Clin. Cancer Res.*, **16**, 2769–2780, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0043.
 55. Forsberg, E.M., Lindberg, M.F., Jespersen, H., Alsen, S., Olofsson Bagge, R., Donia, M., Svane, I.M., Nilsson, O., Ny, L., Nilsson, L.M., and Nilsson, J.A. (2019) HER2 CAR-T cells eradicate uveal melanoma and T cell therapy-resistant human melanoma in interleukin-2 (IL-2) transgenic NOD/SCID IL-2 receptor knockout mice, *Cancer Res.*, **79**, 899–904, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3158.
 56. Jensen, M.C., Popplewell, L., Cooper, L.J., DiGiusto, D., Kalos, M., Ostberg, J.R., and Forman, S.J. (2010) 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.*, **16**, 1245–1256, doi: 10.1016/j.bbmt.2010.03.014.
 57. Junghans, R.P., Ma, Q., Rathore, R., Gomes, E.M., Bais, A.J., Lo, A.S.Y., Abedi, M., Davies, R.A., Cabral, H.J., Al-Homsi, A.S., and Cohen, S.I. (2016) Phase I trial of anti-PSMA designer CAR-T cells in prostate cancer: possible role for interacting interleukin 2-T cell pharmacodynamics as a determinant of clinical response, *Prostate*, **76**, 1257–1270, doi: 10.1002/pros.23214.
 58. Wilkie, S., Burbridge, S.E., Chiapero-Stanke, L., Pereira, A.C.P., Cleary, S., van der Stegen, S.J.C., Spicer, J.F., Davies, D.M., and Maher, J. (2010) Selective expansion of chimeric antigen receptor-targeted T-cells with potent effector function using interleukin-4, *J. Biol. Chem.*, **285**, 25538–25544, doi: 10.1074/jbc.M110.127951.
 59. Papa, S., van Schalkwyk, M., and Maher, J. (2015) Clinical evaluation of ErbB-targeted CAR T-cells, following intracavity delivery in patients with ErbB-expressing solid tumors, *Methods Mol. Biol.*, **1317**, 365–382, doi: 10.1007/978-1-4939-2727-2_21.
 60. Boyman, O., Purton, J.F., Surh, C.D., and Sprent, J. (2007) Cytokines and T-cell homeostasis, *Curr. Opin. Immunol.*, **19**, 320–326, doi: 10.1016/j.coi.2007.04.015.
 61. Xu, Y., Zhang, M., Ramos, C.A., Durett, A., Liu, E., Dakhova, O., Liu, H., Creighton, C.J., Gee, A.P., Heslop, H.E., Rooney, C.M., Savoldo, B., and Dotti, G. (2014) Closely related T-memory stem cells correlate with *in vivo* expansion of CAR-CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15, *Blood*, **123**, 3750–3759, doi: 10.1182/blood-2014-01-552174.
 62. Gargett, T., and Brown, M.P. (2015) Different cytokine and stimulation conditions influence the expansion and immune phenotype of third-generation chimeric antigen receptor T cells specific for tumor antigen GD2, *Cytotherapy*, **17**, 487–495, doi: 10.1016/j.jcyt.2014.12.002.
 63. Casucci, M., Nicolis di Robilant, B., Falcone, L., Camisa, B., Norelli, M., Genovese, P., Gentner, B., Gullotta, F., Ponzoni, M., Bernardi, M., Marcatti, M., Saudemont, A., Bordignon, C., Savoldo, B., Ciceri, F., Naldini, L., Dotti, G., Bonini, C., and Bondanza, A. (2013) CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma, *Blood*, **122**, 3461–3472, doi: 10.1016/j.jcyt.2014.12.002.
 64. Markley, J.C., and Sadelain, M. (2010) IL-7 and IL-21 are superior to IL-2 and IL-15 in promoting human T cell-mediated rejection of systemic lymphoma in immunodeficient mice, *Blood*, **115**, 3508–3519, doi: 10.1182/blood-2009-09-241398.
 65. Perna, S.K., Pagliara, D., Mahendravada, A., Liu, H., Brenner, M.K., Savoldo, B., and Dotti, G. (2014) Interleukin-7 mediates selective expansion of tumor-redirection cytotoxic T lymphocytes (CTLs) without enhancement of regulatory T-cell inhibition, *Clin. Cancer Res.*, **20**, 131–139, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1016.
 66. Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R.A. (2003) The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses, *Immunity*, **19**, 641–644, doi: 10.1016/S1074-7613(03)00296-6.
 67. Trinchieri, G. (1998) Immunobiology of interleukin-12, *Immunol. Res.*, **17**, 269–278.
 68. Trinchieri, G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity, *Nat. Rev. Immunol.*, **3**, 133–146, doi: 10.1038/nri1001.
 69. Strasly, M., Cavallo, F., Geuna, M., Mitola, S., Colombo, M.P., Forni, G., and Bussolino, F. (2001) IL-12 inhibition of endothelial cell functions and angiogenesis depends on lymphocyte-endothelial cell cross-talk, *J. Immunol.*, **166**, 3890–3899, doi: 10.4049/jimmunol.166.6.3890.
 70. Brunda, M.J., Luistro, L., Warrior, R.R., Wright, R.B., Hubbard, B.R., Murphy, M., Wolf, S.F., and Gately, M.K. (1993) Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors, *J. Exp. Med.*, **178**, 1223–1230, doi: 10.1084/jem.178.4.1223.
 71. Kalinski, P., Hilkens, C.M., Wierenga, E.A., and Kapsenberg, M.L. (1999) T-cell priming by type-1 and type-2 pola-

- rized dendritic cells: the concept of a third signal, *Immunol. Today*, **20**, 561–567, doi: 10.1016/S0167-5699(99)01547-9.
72. Curtsinger, J.M., Lins, D.C., and Mescher, M.F. (2003) Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function, *J. Exp. Med.*, **197**, 1141–1151, doi: 10.1084/jem.20021910.
 73. Leonard, J.P., Sherman, M.L., Fisher, G.L., Buchanan, L.J., Larsen, G., Atkins, M.B., Sosman, J.A., Dutcher, J.P., Vogelzang, N.J., and Ryan, J.L. (1997) Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon- γ production, *Blood*, **90**, 2541–2548.
 74. Heinzerling, L., Burg, G., Dummer, R., Maier, T., Oberholzer, P.A., Schultz, J., Elzaouk, L., Pavlovic, J., and Moelling, K. (2005) Intratumoral injection of DNA encoding human interleukin 12 into patients with metastatic melanoma: clinical efficacy, *Hum. Gene Ther.*, **16**, 35–48, doi: 10.1089/hum.2005.16.35.
 75. Grabstein, K.H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M.A., and Ahdieh, M. (1994) Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor, *Science*, **264**, 965–968, doi: 10.1126/science.8178155.
 76. Carson, W.E., Giri, J.G., Lindemann, M.J., Linett, M.L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K., and Caligiuri, M.A. (1994) Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor, *J. Exp. Med.*, **180**, 1395–1403, doi: 10.1084/jem.180.4.1395.
 77. Yeku, O.O., and Brentjens, R.J. (2016) Armored CAR T-cells: utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy, *Biochem. Soc. Trans.*, **44**, 412–418, doi: 10.1042/BST20150291.
 78. Marks-Konczalik, J., Dubois, S., Losi, J.M., Sabzevari, H., Yamada, N., Feigenbaum, L., Waldmann, T.A., and Tagaya, Y. (2000) IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11445–11450, doi: 10.1073/pnas.200363097.
 79. Jakobisiak, M., Golab, J., and Lasek, W. (2011) Interleukin 15 as a promising candidate for tumor immunotherapy, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **22**, 99–108, doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.04.001.
 80. Ramanayake, S., Bilmon, I., Bishop, D., Dubosq, M.-C., Blyth, E., Clancy, L., Gottlieb, D., and Mickelthwaite, K. (2015) Low-cost generation of Good Manufacturing Practice-grade CD19-specific chimeric antigen receptor-expressing T cells using piggyBac gene transfer and patient-derived materials, *Cytotherapy*, **17**, 1251–1267, doi: 10.1016/j.jcyt.2015.05.013.
 81. Numbenjapon, T., Serrano, L.M., Chang, W.-C., Forman, S.J., Jensen, M.C., and Cooper, L. J.N. (2007) Antigen-independent and antigen-dependent methods to numerically expand CD19-specific CD8⁺ T cells, *Exp. Hematol.*, **35**, 1083–1090, doi: 10.1016/j.exphem.2007.04.007.
 82. Nishio, N., and Dotti, G. (2015) Oncolytic virus expressing RANTES and IL-15 enhances function of CAR-modified T cells in solid tumors, *Oncoimmunology*, **4**, e988098, doi: 10.4161/21505594.2014.988098.
 83. Shenoy, A.R., Kirschnek, S., and Hacker, G. (2014) IL-15 regulates Bcl-2 family members Bim and Mcl-1 through JAK/STAT and PI3K/AKT pathways in T cells, *Eur. J. Immunol.*, **44**, 2500–2507, doi: 10.1002/eji.201344238.
 84. Spolski, R., and Leonard, W.J. (2014) Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **13**, 379–395, doi: 10.1038/nrd4296.
 85. Li, Y., and Yee, C. (2008) IL-21 mediated Foxp3 suppression leads to enhanced generation of antigen-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes, *Blood*, **111**, 229–235, doi: 10.1182/blood-2007-05-089375.
 86. Alvarez-Fernandez, C., Escriba-Garcia, L., Vidal, S., Sierra, J., and Briones, J. (2016) A short CD3/CD28 costimulation combined with IL-21 enhance the generation of human memory stem T cells for adoptive immunotherapy, *J. Transl. Med.*, **14**, 214, doi: 10.1186/s12967-016-0973-y.
 87. Moroz, A., Eppolito, C., Li, Q., Tao, J., Clegg, C.H., and Shrikant, P.A. (2004) IL-21 enhances and sustains CD8⁺ T cell responses to achieve durable tumor immunity: comparative evaluation of IL-2, IL-15, and IL-21, *J. Immunol.*, **173**, 900–909, doi: 10.4049/jimmunol.173.2.900.
 88. Hashmi, M.H., and van Veldhuizen, P.J. (2010) Interleukin-21: updated review of phase I and II clinical trials in metastatic renal cell carcinoma, metastatic melanoma and relapsed/refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **10**, 807–817, doi: 10.1517/14712598.2010.480971.
 89. Singh, H., Figliola, M.J., Dawson, M.J., Huls, H., Olivares, S., Switzer, K., Mi, T., Maiti, S., Kebriaei, P., Lee, D.A., Champlin, R.E., and Cooper, L.J.N. (2011) Reprogramming CD19-specific T cells with IL-21 signaling can improve adoptive immunotherapy of B-lineage malignancies, *Cancer Res.*, **71**, 3516–3527, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3843.

THE ROLE OF CHECKPOINT INHIBITORS AND CYTOKINES IN ADOPTIVE CELL-BASED CANCER IMMUNOTHERAPY WITH GENETICALLY MODIFIED T-CELLS

P. M. Gershovich^{1,2*}, A. V. Karabelskii^{1,2}, A. B. Ulitin¹, and R. A. Ivanov¹

¹ CJSC Biocad, 198515 St. Petersburg, Russia; E-mail: gershovich@biocad.ru

² St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, 197376 St. Petersburg, Russia

Received March 1, 2019

Revised April 8, 2019

Accepted April 8, 2019

This review is focused on the structure and molecular mechanism of chimeric antigen receptor (CAR) efficiency, main aspects of the cell-based product manufacturing technology and clinical application of CAR-T (CAR-modified T lymphocytes) therapy for treatment of hematological and solid tumors. Data referred with an emphasis on the strategies using CAR-T combined with immuno-oncological monoclonal antibodies – checkpoint inhibitors – or various cytokines to boost survival, persistence and anti-tumor efficiency of CAR-T. In addition, the review describes preclinical and clinical data on additive effects of CAR-T therapy combined with monoclonal antibodies targeting immune checkpoints and with a number of interleukins.

Keywords: adoptive T-cell immunotherapy for cancer, chimeric antigen receptor, CAR-T, immuno-oncology, immune checkpoint inhibitors, cytokines, interleukins