

e-ISSN: 2345-0592 <b>Online issue</b> Indexed in <i>Index Copernicus</i>	<b>Medical Sciences</b>  Official website: <a href="http://www.medicisciences.com">www.medicisciences.com</a>	
--	--	---

## Car t cells in cancer immunotherapy

Jokūbas Liutkus<sup>1</sup>, Dalia Zykutė<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Faculty of Medicine, Kaunas, Lithuania.*

### Abstract

Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy is at the forefront of cancer immunotherapy development. The number of ongoing autologous and allogeneic CAR T cell clinical trials has increased exponentially, with more than 30% of studies researching solid tumor therapies. CAR T cells are genetically engineered cells with artificial CAR receptors, capable of specific targeting of antigen in MHC-independent manner. Two autologous anti-CD19 CAR T cell therapies approved in Europe and USA, tisagenlecleucel and axicabtagene ciloleucel, have been authorized for treatment of refractory or relapsed B cell acute lymphoblastic leukemia and diffuse large B cell lymphomas with potent and long-lasting responses. Unfortunately, these medicines require a long production process and are prohibitively expensive. Although allogeneic CAR T cells can cause dangerous graft-versus-host disease and have reduced persistence after transfer, there have been many developments in gene editing and biotechnology that provide solutions for these challenges. The adoption of allogeneic CAR T cells would have the benefit of decreased therapy costs, improved access and standardized production protocols allowing further cell editing and modification, improved treatment response rates. In this review article we discuss the structure of chimeric antigen receptors, manufacture of autologous CAR T cell therapies, efficacy of currently approved medications, advances and development strategies of allogeneic CAR T cell therapies for hematologic malignancies and solid tumors.

**Key words:** Adoptive immunotherapy, chimeric antigen receptors, axicabtagene ciloleucel, tisagenlecleucel.

## Car t ląstelės vėžio imunoterapijoje

Jokūbas Liutkus<sup>1</sup>, Dalia Zykutė<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lietuvos Sveikatos Mokslų Universitetas, Medicinos akademija, Medicinos fakultetas, Kaunas, Lietuva.

### Santrauka

Chimerinių antigeno receptorių (CAR) T ląstelių terapija yra viena iš perspektyviausių ir labiausiai vystomų onkologinės imunoterapijos sričių. Autologinių ir alogeninių CAR T ląstelių terapijos pritaikymo klinikinių tyrimų skaičius didėja eksponentiškai, daugiau nei 30% tyrimų vykdomi su solidiniais navikais. CAR T ląstelės yra genetiškai modifikuotos ląstelės su dirbtiniais CAR receptoriais, galinčiais specifiskai atpažinti antigeną, nepriklausomai nuo MHC molekulių sąveikos. Du Europoje ir JAV patvirtinti autologiniai anti-CD19 CAR T ląstelių preparatai, tisagenlekleucelas ir aksikabtagenas ciloleucelas, yra patvirtinti atsparios ar recidyvavusios B ląstelių ūminės limfoblastinės leukemijos ir difuzinės didelių B ląstelių limfomos gydymui. Preparatai pasižymi efektyviu atsaku ir ilgai išliekančia remisija, tačiau gamybinis procesas užtrunka vidutiniškai tris savaites, gydymo kursas yra brangus. Alogeninių CAR T ląstelių taikymas suteiktų papildomų privalumų. Būtų galima mažinti gydymo kainą, didinti prieinamumą ir standartizuoti gamybos protokolus, leidžiant papildomai modifikuoti ir redaguoti ląsteles, gerinti atsaką į gydymą. Nors alogeninės CAR T ląstelės gali sukelti pavojingą transplanto-prieš-šeiminką ligą ir pasižymi trumpesne persistencija organizme, pasitelkiant genų redagavimą ir biotechnologijų laimėjimus, pradedama ieškoti tinkamų šių problemų sprendimo būdų. Šiame straipsnyje apžvelgiama chimerinių antigeno receptorių struktūra, autologinių CAR T ląstelių preparatų gamybos procesas, patvirtintų preparatų efektyvumas, alogeninių CAR T ląstelių terapijos hematologiniams ir solidiniams navikams iššūkiai ir vystymo strategijos.

**Raktiniai žodžiai:** Vėžio imunoterapija, chimeriniai antigeno receptoriai, aksikabtagenas ciloleucelas, tisagenlekleucelas.

## 1. Įvadas

Vėžio imunoterapija pradeda tapti geriausios klinikinės praktikos standartu navikų gydymui. Imunoterapija monokloniniais antikūnais, imuninės sistemos kontrolės taškų inhibitoriais, tapo vienu didžiausių onkologijos laimėjimų ir pakeitė pacientų, sergančių krūties vėžiu bei melanoma išgyvenamumo prognozę (1). Pirmieji naujos kartos vėžio imunoterapijos preparatai – gydančiosios vakcinos prostatos vėžiui (2) ir melanomai (3), BiTE (angl. bispecific T-cell engagers) bispecifiniai antikūnai (4) ūminei limfoblastinei leukemijai (ŪLL) bei chimerinių antigeno receptorių (CAR) T ląstelių terapija ŪLL ir B ląstelių limfomų gydymui (5) – yra patvirtinti ir skinasi kelią į klinikinę praktiką. CAR T ląstelių terapija remiasi dirbtinių receptorių, atpažįstančių norimą ligandą, kūrimu ir jų įterpimu į natyvines žmogaus T ląsteles. Tokios genetiškai modifikuotos CAR T ląstelės turi didesnę specifiškumą navikinių ląstelių antigenams ir aktyvindamos imuninį atsaką gali sukelti navikinių ląstelių destruktiją.

## 2. Chimerinių antigeno receptorių struktūra

Šiuo metu klinikinėje praktikoje naudojami CAR yra sudaryti iš trijų komponentų: išorinio antigeną prijungiančio domeno, transmembraninio sujungiančio domeno bei vidinio signalinio domeno. Kiekvienas iš jų turi savo funkciją, tačiau individualių fragmentų molekulinė struktūra gali būti labai įvairi.

Išorinis antigeną prijungiantis domenas dažniausiai sudaromas panaudojant vienos grandinės variabelių fragmentą (scFv), sudarytą iš imunoglobulino sunkiosios ir lengvosios grandinių variabelių regionų, prijungiančių antigenus (6). Chimerinių receptorių antigeno atpažinimas tampa panašus į monokloninio antikūno – yra nepriklausomas nuo MHC komplekso ir genetinio T ląstelių programavimo (7) ir gali būti individualizuojamas norimam taikiniui. Galimi ir T ląstelių receptoriai (TCR) primenantys CAR, atpažįstantys intraląstelinius fragmentus pateikiamus MHC molekulių paviršiuose (8). Domeno scFv afinitetas antigenui yra svarbus CAR T ląstelių funkcijai ir turi būti pakankamas jų aktyvacijai (9). Tačiau, per didelis afinitetas gali lemti pačios T ląstelės žūtį bei toksinį poveikį organizmui (10). Išorinis domenas gali būti įvairios struktūros: klinikiniuose tyrimuose naudojami ir ligandais (11), citokiniais (12), de novo sintezuotais peptidais (13) paremti išoriniai domenai.

Vidinis signalinis domenas remiasi natyviu CD3-ζ TCR fragmentu, kuris inicijuoja vidinį T ląstelės signalo aktyvavimą per tirozino liekanų fosforilinimą (14), tačiau pirmosios kartos CAR T ląstelių tyrimuose ląstelių atsakas nebuvo pakankamas (15). Kadangi natūraliam veiksmingui T ląstelės atsakui be CD3-ζ aktyvacijos reikalingas ir ko-stimuliacinis signalas (CD28, 4-1BB ir kiti), antrosios kartos CAR T ląstelės panaudojo ir į CAR integruotus kostimuliacinius domenus (16): antigeno atpažinimas išoriniu domenu inicijuoja tiek CD3-ζ, tiek papildomą signalą, ko pasekoje

išvengiama papildomų ligandų ir receptorių sąveikos poreikio išoriniame ląstelės paviršiuje. Naudojami ko-stimuliaciniai signalai geba keisti T ląstelių funkcijas. CD28 ląstelės diferencijuojasi į efektorines atminties T ląsteles, tuo tarpu 4-1BB lemia diferenciaciją į centrinės atminties ląsteles (T<sub>CM</sub>) (17). Šios struktūros CD28-CAR ir 4-1BB-CAR T ląstelės yra patvirtintos B ląstelių navikų gydymui (18). Eksperimentuojama ir su trečios bei ketvirtos kartos CAR T ląstelėmis, inkorporuojančiomis papildomus ko-stimuliacinius ar funkcijos įgijimo (angl. gain-of-function) domenus (19).

### 3. Autologinės CAR T ląstelės

#### 3.1. Preparato gamybos procesas

Autologinė CAR T ląstelių terapija remiasi paties paciento limfocitų panaudojimu, į juos įterpiant chimerinius antigeno receptorius. Leukocitai yra surenkami leukoferezės proceso metu, norimos klasės T ląstelės yra atrenkamos gryninimo proceso metu, cetrifugavimo ar magnetinio atskyrimo metodais (20). Limfocitai sėjami į kultūrą ir yra veikiami dirbtinėmis antigeną pateikiančiomis ląstelėmis, kurios sukelia polikloninę stimuliaciją (21). Chimerinio antigeno receptoriaus genetinė informacija yra įterpiama į ląstelių genomą naudojant virusinį vektorių (22), elektroporaciją (23) ar CRISPR/Cas9 sistemą (24). T ląstelėje vyksta įterpto genetinio kodo transkripcija ir transliacija, nauji sintezuoti CAR yra ekspresuojami ląstelės paviršiuje (25). Ląstelių kultūra yra dauginama bioreaktoriuje, koncentruojama, imami mėginiai vertinti kultūros kokybę, sterilumą,

saugumą (18). Testavimas yra pagrįstas ląstelių gyvybingumo vertinimu, imunofenotipavimu, dažymu gramo būdu, bakterijų ir grybelių bei jų toksinų aptikimu (26). Galutinis patvirtintas produktas krioprezervuojamas ir siunčiamas į reikiamą gydymo įstaigą. Nors ląstelių gamyba užtrunka vidutiniškai 8 dienas, laikas nuo leukoferezės iki galutinio produkto infuzijos gali užtrukti iki 4 savaičių (27), priklauso nuo paciento klinikinės būsenos bei paruošiamojo gydymo intensyvumo. Autologinių T ląstelių privalumas yra alogeninės reakcijos nebuvimas, todėl infuzuotos CAR T ląstelės gali persistuoti iki 24 ir daugiau mėnesių po gydymo (28).

#### 3.2. Patvirtinti preparatai

Šiuo metu, JAV maisto ir vaistų administracija (FDA) ir Europos vaistų agentūra (EMA) yra patvirtinusios du autologinius CAR T ląstelių preparatus.

Pirmasis, tisagenlekleucel (Kymriah, Novartis), yra pagrįstas autologinėmis CAR T ląstelėmis, turinčiomis anti-CD19 chimerinius receptorius. Preparatas pagamintas naudojant antrosios kartos chimerinių receptorių ląsteles, kurių vidinis signalinis domenas susideda iš CD3- $\zeta$  ir 4-1BB fragmentų (29). Terapinės preparato indikacijos (30) yra atspari ar recidyvavusi B ląstelių ūminė limfoblastinė leukemija (ŪLL) bei atspari ar recidyvavusi difuzinė didelių B ląstelių limfoma (DDBLL). Preparato autorizavimas buvo pagrįstas ELIANA tyrimo (31) metu gautu geresniu atsaku ŪLL sergantiems pacientams (18 mėnesių remisijos trukmės tikimybė 0,633; bendrasis remisijos dažnis (BRD) 0,823

(95% PI 0,721 – 0,900)) lyginant su 0,200 BRD gydant klofarabinu, 0,390 BRD BiTE antikūnu blinatumomabu. JULIET tyrime (32), pacientų sergančių DDBLL atsakas (objektyvaus atsako dažnis (OAD) 0,535 (95% PI 0,432 – 0,636); 24 mėnesių išgyvenamumas 0,391) buvo geresnis nei lyginamojo retrospektyvaus standartinės terapijos efektyvumą vertinusio SCHOLAR-1 (OAD 0,26 (95% PI 0,21 – 0,31) ir 0,20 (95% PI 0,16 – 0,23) 24 mėnesių išgyvenamumas) (33). Tisagenlekleucelas yra įtrauktas į pediatriinės bei suaugusiųjų ŪLL, B ląstelių limfomų gydymo „National Comprehensive Cancer Network“ (NCCN) klinikinės praktikos gaires (34,35).

Antrasis anti-CD19 CAR T ląstelių preparatas, aksikabtagenas ciloleucelas (Yescarta, Kite Pharma), skiriasi savo vidiniu signaliniu domenu, kuriame CD3-ζ papildantis ko-stimuliacinis signalas perduodamas per CD28 (36). Preparatas indikuotinas (37) atsparios ar recidyvavusios DDBLL bei pirminės tarpuplaučio didelių B ląstelių limfomos (PTBLL) gydymui. Vaisto autorizacija rėmėsi ZUMA-1 tyrimo (36) duomenimis: OAD 0,74 (95% PI 0,65 – 0,82), 24 mėnesių išgyvenamumas 0,505 (95% PI 0,404 – 0,597) lyginant su OAD 0,26 (95% PI 0,21 – 0,31) ir 0,20 (95% PI 0,16 – 0,23) 24 mėnesių išgyvenamumas SCHOLAR-1 (33). Aksikabtagenas ciloleucelas įtrauktas į B ląstelių limfomų gydymo NCCN klinikinės praktikos gaires (35).

Abu preparatai patvirtinti ES ir JAV nuo 2018 metų, tačiau terapija yra brangi, kol kas nėra ilgalaikį klinikinį efektyvumą

įvertinančių tyrimų.. Tačiau efektyvumo vertinimas yra sudėtingas dėl naudotų vienos grupės tyrimo tipų, intensyvių gydymo schemų, palyginamosios auksinio standarto terapijos nebuvimo. Tisagenlekleucelo efektyvumas ir saugumas ŪLL gydyme vertinamas 3 fazės NCT03628053 tyrime. Aksikabtageną ciloleucelą taip pat bandoma patvirtinti leukemijų gydymui – po sėkmingų 1 fazės rezultatų (38), atliekami 2 fazės ŪLL (NCT02614066, NCT02625480) bei lėtinės limfocitinės leukemijos (LLL) NCT03624036 gydymo efektyvumo tyrimai. Produktai yra testuojami ir kitoms indikacijoms, todėl ateityje bus daugiau informacijos apie preparatų naudos-rizikos santykį.

Limfomų gydyme, tisagenlekleucelą bandoma kombinuoti su pembrolizumabu bei ibrutinibu (NCT03630159, NCT03876028). Atitinkamai, aksikabtageną ciloleucelą – su atezolizumabu (NCT02926833), 4-1BB agonistu utomilumabu NCT03704298 bei rituximabu NCT04002401 tyrimuose.

#### 4. Alogeninės CAR T ląstelės

Autologinių CAR ląstelių preparatų gamybai, limfocitų modifikacija vykdoma pagal individualų užsakymą. Šis gamybinis procesas užtrunka vidutiniškai tris savaites, pasižymi dideliais kaštais (Vokietijoje vieno paciento gydymas Kymriah ar Yescarta kainuoja apie €320,000 (39)) bei gali būti nesėkmingas daliai pacientų. Gamybos trukmė yra ypatingai aktuali pacientams su agresyviomis leukemijos formomis. Taikytas gydymas, vėžinio proceso sąlygota imunosupresija gali lemti paciento T ląstelių

veiklos sutrikimus (40). Šių pasekmių galima išvengti naudojant alogenines CAR T ląsteles, kurtas iš sveikų donorų. Ląstelių šaltiniu gali būti periferinis kraujas (41), virkštelės kraujas (42) ar indukuotos pluripotentinės kamieninės ląstelės (43). Gamybos procesų standartizacija ir masinė preparatų produkcija leistų mažinti vaistų kainą, keisti gydymo schemas (44), plėsti CAR T ląstelių taikinių skaičių – vykdomi tyrimai su karcinoembrioninio antigeno (CEA) (45), B ląstelių brendimo baltymo (BCMA) (46), mezotelino (47) ir kitais taikiniai (48).

#### 4.1. Transplantato prieš šeimininką liga

Vienas pagrindinių alogeninės ląstelių terapijos trūkumų yra transplantato-prieš-šeimininką liga. Tai viena pagrindinių pacientų morbiditeto ir mirtingumo priežasčių taikant alogeninę kraujodaros kamieninių ląstelių transplantaciją (KKLT) (49). Šis donoro ir recipiento žmogaus leukocitų antigenų (HLA) molekulių neatitikimas yra sąlygotas  $\alpha\beta$  T ląstelių (50), atpažįstančių svetimas MHC komplekso struktūras. Viena iš išiečių yra taikyti HLA sutapatinto donoro T ląsteles (51), tačiau šis būdas yra prieinamas tik KKLT pacientams. Alternatyva – naudoti virusams specifiskas atminties T ląsteles, kurios dėl riboto atsako nesukelia transplantato-prieš-šeimininką ligos (52), arba taikyti ne  $\alpha\beta$  T ląsteles, neturinčias sąveikos su MHC kompleksais, tačiau išsaugančias citotoksiinį poveikį. Tokių ląstelių žmogaus organizme yra daug: vykdomi klinikiniai tyrimai su CAR modifikuotais natūraliaisiais žudikais (NK) (42), natūraliųjų žudikų paviršiaus markerius

ekspresuojančiomis T ląstelėmis (iNKT) (48),  $\gamma\delta$  T ląstelėmis (53), MAIT T ląstelėmis (54). Be mažesnės transplantato-prieš-šeimininką ligos rizikos, šių ląstelių naudojimas susijęs ir su retesnėmis nepageidaujamos citokinų audros sindromo reakcijomis (44).

Genų inžinerija leidžia kurti CAR T ląsteles su panaikintais natyviniais  $\alpha\beta$  TCR, lemiančiais T ląstelių aloreaktyvumą. Genetinio kodo redagavimas atliekamas su transkripcijos aktyvavimą primenančiomis efektorinėmis nukleazėmis (TALEN) (55), dirbtinėmis chimerinėmis MegaTAL nukleazėmis (56), CRISPR-Cas9 (57) ir alternatyviomis CRISPR sistemos nukleazėmis (58). Nukleazės vykdo dvigrandinius DNR trūkius, dažniausiai TCR  $\alpha$  grandinę koduojančiame genomo regione (59). Toks natyvinio  $\alpha\beta$  TCR receptoriaus eliminavimas nedaro įtakos CAR T ląstelių efektyvumui (60), aloreaktyvumo nebuvimas yra patvirtintas in vivo ląstelių (22) ir klinikiniais pacientų tyrimais (61).

#### 4.2. Donorinių ląstelių destrukcija

Antrasis alogeninių CAR T ląstelių trūkumas yra recipientų imuninės sistemos sąlygota donorinių ląstelių destrukcija, lemianti trumpą jų išlikimo laiką organizme (62). Siekiant ilgai trunkančio terapijos atsako, galimi pakartotiniai alogeninių CAR T ląstelių dozavimo kursai, prilyginami KKLT konsolidavimo etapui (63). Kartotinis dozavimas gali būti toksiškas pacientui bei esamoms CAR ląstelėms dėl taikomo paruošiamojo limfodeplecinio gydymo (64). Eksperimentuojama su papildoma CAR T

ląstelių genetinė modifikacija, apsaugančia donorines ląsteles nuo limfodeplecinės chemoterapijos, taip didinant jų išgyvenamumą lyginant su natyviniais paciento limfocitais (65).

Paciento imuninės sistemos atmetimo reakcijos galima išvengti ir eliminuojant CAR T ląstelių MHC I klasės molekules (66), atsakingas už aloreaktyvumą. Tačiau, MHC molekulės yra svarbios NK ląstelių inhibicijai, todėl modifikuotos CAR T ląstelės būtų jautresnės recipiento NK ląstelių atpažinimui ir destrukcijai (67). Papildoma ląstelių modifikacija siekiant inhibuoti NK galima indukuojant siglec 7 ligando ekspresiją (68).

#### 4.3. Alogeninių preparatų panaudojimas

Aloginės CAR T ląstelės galėtų būti naudojamos tiek hematologinio, tiek solidinio vėžio gydymui (69), tačiau šiuo metu nėra patvirtintų farmakologinių preparatų. Vykdomi pirminės ir recidyvavusios ŪLL (NCT03229876, NCT02746952), ūminės mieloleukemijos (ŪML) NCT03190278, limfomų NCT02735083, dauginės mielomos NCT03958656 gydymo tyrimai, atliekamas preparatų kombinavimas su imuninės sistemos kontrolės taškų inhibitoriais NCT02650999. Trumpa alogeninių CAR T ląstelių persistencija organizme gali būti panaudojama ir ląstelių terapiją taikant kaip tiltą gydomajai alogeninei KKL (70). Solidinių navikų gydymas tradicinėmis autologinėmis CAR T ląstelėmis nebuvo sėkmingas (18). Papildomas alogeninių CAR T ląstelių genetinis modifikavimas ir standartizavimas gali padėti išvengti naviko

imunosupresinės mikroaplinkos, inhibuojančios imuninės sistemos ląstelių veiklą (47). Siekiant gerinti CAR ląstelių patekimą į naviką, persistenciją ir efektyvumą, eksperimentuojama su T ląstelėmis ekspresuojančiomis katalazę (71), turinčiomis integruotą anti-PD1 poveikį (72) ar daugybinius skaldytus CAR, gebančius reaguoti į platesnį naviko antigenų ar chemokinių spektrą (73).

## 5. Išvados

Autologiniai CAR T ląstelių terapijos preparatai tisagenlekleucelas ir aksikabtagenai ciloleucelas yra efektyvūs ir klinikiškai naudingi pacientams, sergantiems piktybinėmis B ląstelių ligomis. Biotechnologijų ir genų inžinerijos laimėjimai leidžia tobulinti CAR ląstelių konstrukcijas, plėsti naudojamų terapijai ląstelių spektrą bei naudoti alogenines CAR ląsteles, kurios sąlygotų mažėjančius gydymo kaštus ir didesnę prieinamumą. Tobulėjantys mažesnio toksiškumo preparatai, jų kombinavimas su imuninės sistemos patikros taškų ar kinazių inhibitoriais, BiTE ar monokloniniais antikūnais, gali didinti ląstelių terapijos efektyvumą, atsako trukmę, plėsti panaudojimo indikacijas hematologiniams bei solidiniams navikams. Akademinių centrų, biotechnologinių ir farmacinių įmonių vykdomų mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros projektų gausa rodo šios naujos farmakoterapijos šakos potencialą, galintį sukelti revoliuciją onkologinių susirgimų gydyme.

**Literatūros sąrašas**

1. Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2019; 19(3): 133–50.
2. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*. 2010; 363(5): 411–22.
3. Andtbacka RHI, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, Delman KA, Spitler LE, Puzanov I, Agarwala SS, et al. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol*. 2015; 33(25): 2780–8.
4. Klinger M, Brandl C, Zugmaier G, Hijazi Y, Bargou RC, Topp MS, Gokbuget N, Neumann S, Goebeler M, Viardot A, et al. Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood*. 2012; 119(26): 6226–33.
5. Elsallab M, Levine BL, Wayne AS, Abou-El-Enein M. CAR T-cell product performance in haematological malignancies before and after marketing authorisation. *Lancet Oncol*. 2020; 21(2): e104–16.
6. Bailey SR, Maus M V. Gene editing for immune cell therapies. *Nat Biotechnol*. 2019; 37(12): 1425–34.
7. June CH, Sadelain M. Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N Engl J Med*. 2018; 379(1): 64–73.
8. He Q, Jiang X, Zhou X, Weng J. Targeting cancers through TCR-peptide/MHC interactions. *J Hematol Oncol*. 2019; 12(1): 139.
9. Fujiwara K, Masutani M, Tachibana M, Okada N. Impact of scFv structure in chimeric antigen receptor on receptor expression efficiency and antigen recognition properties. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020; .
10. Sakemura R, Terakura S, Watanabe K, Julamane J, Takagi E, Miyao K, Koyama D, Goto T, Hanajiri R, Nishida T, et al. A Tet-On Inducible System for Controlling CD19-Chimeric Antigen Receptor Expression upon Drug Administration. *Cancer Immunol Res*. 2016; 4(8): 658–68.
11. Hoogi S, Eisenberg V, Mayer S, Shamul A, Barliya T, Cohen CJ. A TIGIT-based chimeric co-stimulatory switch receptor improves T-cell anti-tumor function. *J Immunother cancer*. 2019; 7(1): 243.
12. Brown CE, Alizadeh D, Starr R,



- Weng L, Wagner JR, Naranjo A, Ostberg JR, Blanchard MS, Kilpatrick J, Simpson J, et al. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N Engl J Med.* 2016; 375(26): 2561–9.
13. Sieglar E, Li S, Kim YJ, Wang P. Designed Ankyrin Repeat Proteins as Her2 Targeting Domains in Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells. *Hum Gene Ther.* 2017; 28(9): 726–36.
14. Sun ZJ, Kim KS, Wagner G, Reinherz EL. Mechanisms contributing to T cell receptor signaling and assembly revealed by the solution structure of an ectodomain fragment of the CD3 epsilon gamma heterodimer. *Cell.* 2001; 105(7): 913–23.
15. Pule MA, Savoldo B, Myers GD, Rossig C, Russell H V, Dotti G, Huls MH, Liu E, Gee AP, Mei Z, et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med.* 2008; 14(11): 1264–70.
16. Long AH, Haso WM, Shern JF, Wanhainen KM, Murgai M, Ingaramo M, Smith JP, Walker AJ, Kohler ME, Venkateshwara VR, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med.* 2015; 21(6): 581–90.
17. Kawalekar OU, O'Connor RS, Fraietta JA, Guo L, McGettigan SE, Posey ADJ, Patel PR, Guedan S, Scholler J, Keith B, et al. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity.* 2016; 44(2): 380–90.
18. Majzner RG, Mackall CL. Clinical lessons learned from the first leg of the CAR T cell journey. *Nat Med.* 2019; 25(9): 1341–55.
19. Martinez M, Moon EK. CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 2019; 10: 128.
20. Fesnak A, Lin C, Siegel DL, Maus M V. CAR-T Cell Therapies From the Transfusion Medicine Perspective. *Transfus Med Rev.* 2016; 30(3): 139–45.
21. Shrestha B, Zhang Y, Yu B, Li G, Boucher JC, Beatty NJ, Tsai H-C, Wang X, Mishra A, Sweet K, et al. Generation of Antitumor T Cells For Adoptive Cell Therapy With Artificial Antigen Presenting Cells. *J Immunother.* 2020; 43(3): 79–88.
22. Fraietta JA, Nobles CL, Sammons MA, Lundh S, Carty SA, Reich TJ, Cogdill AP, Morrissette JJD, DeNizio JE, Reddy S, et al. Disruption of TET2 promotes the

- therapeutic efficacy of CD19-targeted T cells. *Nature*. 2018; 558(7709): 307–12.
23. Svoboda J, Rheingold SR, Gill SI, Grupp SA, Lacey SF, Kulikovskaya I, Suhoski MM, Melenhorst JJ, Loudon B, Mato AR, et al. Nonviral RNA chimeric antigen receptor-modified T cells in patients with Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2018; 132(10): 1022–6.
24. Ren J, Zhao Y. Advancing chimeric antigen receptor T cell therapy with CRISPR/Cas9. *Protein Cell*. 2017; 8(9): 634–43.
25. Sachdeva M, Busser BW, Temburni S, Jahangiri B, Gautron A-S, Marechal A, Juillerat A, Williams A, Depil S, Duchateau P, et al. Repurposing endogenous immune pathways to tailor and control chimeric antigen receptor T cell functionality. *Nat Commun*. 2019; 10(1): 5100.
26. Mahmoudjafari Z, Hawks KG, Hsieh AA, Plesca D, Gatwood KS, Culos KA. American Society for Blood and Marrow Transplantation Pharmacy Special Interest Group Survey on Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy Administrative, Logistic, and Toxicity Management Practices in the United States. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019; 25(1): 26–33.
27. Papathanasiou MM, Stamatis C, Lakelin M, Farid S, Titchener-Hooker N, Shah N. Autologous CAR T-cell therapies supply chain: challenges and opportunities? *Cancer Gene Ther*. 2020; .
28. Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, Nasta SD, Mato AR, Anak O, Brogdon JL, Pruteanu-Malinici I, Bhoj V, Landsburg D, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med*. 2017; 377(26): 2545–54.
29. Laetsch TW, Myers GD, Baruchel A, Dietz AC, Pulsipher MA, Bittencourt H, Buechner J, De Moerloose B, Davis KL, Nemecek E, et al. Patient-reported quality of life after tisagenlecleucel infusion in children and young adults with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukaemia: a global, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2019; 20(12): 1710–8.
30. European Medicines Agency. Kymriah [Internet]. European public assessment report. 2020 [cited 2020 Jan 17]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kymriah>
31. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, Bader P, Verneris MR, Stefanski HE, Myers GD, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018; 378(5): 439–48.

32. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, Jager U, Jaglowski S, Andreadis C, Westin JR, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2019; 380(1): 45–56.
33. Crump M, Neelapu SS, Farooq U, Van Den Neste E, Kuruvilla J, Westin J, Link BK, Hay A, Cerhan JR, Zhu L, et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood.* 2017; 130(16): 1800–8.
34. National Comprehensive Cancer Network. Acute lymphoblastic leukemia [Internet]. Version 1.2020. National Comprehensive Cancer Network; 2020 [cited 2020 Mar 5]. Available from: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/default.aspx#all](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx#all)
35. National Comprehensive Cancer Network. B-Cell Lymphomas [Internet]. Version 1.2020. National Comprehensive Cancer Network; 2020 [cited 2020 Mar 5]. Available from: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/default.aspx#b-cell](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx#b-cell)
36. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, Braunschweig I, Oluwole OO, Siddiqi T, Lin Y, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2017; 377(26): 2531–44.
37. European Medicines Agency. Yescarta [Internet]. European public assessment report. 2020 [cited 2020 Feb 3]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/yescarta>
38. Shah B, Bishop M, Oluwole O, Logan A, Baer M, Donnellan W, Carr-O'Dwyer K, Holmes H, Arellano M, Ghobadi A, et al. End of phase I results of ZUMA-3, a phase 1/2 study of KTE-X19, anti-CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy, in adult patients (pts) with relapsed/refractory (R/R) acute lymphoblastic leukemia (ALL). *J Clin Oncol.* 2019; 37: 7006.
39. Jørgensen J, Hanna E, Kefalas P. Outcomes-based reimbursement for gene therapies in practice: the experience of recently launched CAR-T cell therapies in major European countries. *J Mark access Heal policy.* 2020; 8(1): 1715536.
40. Fagnoni FF, Lozza L, Zibera C, Zambelli A, Ponchio L, Gibelli N, Oliviero B, Pavesi L, Gennari R, Vescovini R, et al. T-cell dynamics after high-dose chemotherapy in adults: elucidation of the elusive CD8+ subset reveals multiple homeostatic T-cell compartments with distinct implications for immune competence. *Immunology.*

- 2002; 106(1): 27–37.
41. Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2016; 16(9): 566–81.
42. Liu E, Marin D, Banerjee P, Macapinlac HA, Thompson P, Basar R, Nassif Kerbaui L, Overman B, Thall P, Kaplan M, et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med*. 2020; 382(6): 545–53.
43. Themeli M, Kloss CC, Ciriello G, Fedorov VD, Perna F, Gonen M, Sadelain M. Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy. *Nat Biotechnol*. 2013; 31(10): 928–33.
44. Depil S, Duchateau P, Grupp SA, Mufti G, Poirot L. “Off-the-shelf” allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2020; 19(3): 185–99.
45. Holzinger A, Abken H. CAR T cells targeting solid tumors: carcinoembryonic antigen (CEA) proves to be a safe target. Vol. 66, *Cancer immunology, immunotherapy: CII*. Germany; 2017. p. 1505–7.
46. Shah N, Chari A, Scott E, Mezzi K, Usmani SZ. B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches. *Leukemia*. 2020; 34(4): 985–1005.
47. Li Y, Xiao F, Zhang A, Zhang D, Nie W, Xu T, Han B, Seth P, Wang H, Yang Y, et al. Oncolytic adenovirus targeting TGF-beta enhances anti-tumor responses of mesothelin-targeted chimeric antigen receptor T cell therapy against breast cancer. *Cell Immunol*. 2020; 348: 104041.
48. MacKay M, Afshinnekoo E, Rub J, Hassan C, Khunte M, Baskaran N, Owens B, Liu L, Roboz GJ, Guzman ML, et al. The therapeutic landscape for cells engineered with chimeric antigen receptors. *Nat Biotechnol*. 2020; 38(2): 233–44.
49. Penack O, Marchetti M, Ruutu T, Aljurf M, Bacigalupo A, Bonifazi F, Ciceri F, Cornelissen J, Malladi R, Duarte RF, et al. Prophylaxis and management of graft versus host disease after stem-cell transplantation for haematological malignancies: updated consensus recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet Haematol*. 2020; 7(2): e157–67.
50. Radestad E, Wikell H, Engstrom M, Watz E, Sundberg B, Thunberg S, Uzunel M, Mattsson J, Uhlin M. Alpha/beta T-cell depleted grafts as an immunological booster to treat graft failure after hematopoietic stem cell transplantation with HLA-

- matched related and unrelated donors. *J Immunol Res.* 2014; 2014: 578741.
51. Kochenderfer JN, Dudley ME, Carpenter RO, Kassim SH, Rose JJ, Telford WG, Hakim FT, Halverson DC, Fowler DH, Hardy NM, et al. Donor-derived CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2013; 122(25): 4129–39.
52. Fuji S, Kapp M, Einsele H. Alloreactivity of virus-specific T cells: possible implication of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effects. *Front Immunol.* 2013; 4: 330.
53. Sebestyén Z, Prinz I, Dechanet-Merville J, Silva-Santos B, Kuball J. Translating gammadelta (gammadelta) T cells and their receptors into cancer cell therapies. *Nat Rev Drug Discov.* 2020; 19(3): 169–84.
54. Crowther MD, Dolton G, Legut M, Caillaud ME, Lloyd A, Attaf M, Galloway SAE, Rius C, Farrell CP, Szomolay B, et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 screening reveals ubiquitous T cell cancer targeting via the monomorphic MHC class I-related protein MR1. *Nat Immunol.* 2020; 21(2): 178–85.
55. Gautron A-S, Juillerat A, Guyot V, Filhol J-M, Dessez E, Duclert A, Duchateau P, Poirot L. Fine and Predictable Tuning of TALEN Gene Editing Targeting for Improved T Cell Adoptive Immunotherapy. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2017; 9: 312–21.
56. Hale M, Lee B, Honaker Y, Leung W-H, Grier AE, Jacobs HM, Sommer K, Sahni J, Jackson SW, Scharenberg AM, et al. Homology-Directed Recombination for Enhanced Engineering of Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017; 4: 192–203.
57. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013; 339(6121): 819–23.
58. Nihongaki Y, Otabe T, Ueda Y, Sato M. A split CRISPR-Cpf1 platform for inducible genome editing and gene activation. *Nat Chem Biol.* 2019; 15(9): 882–8.
59. Rasaiyaah J, Georgiadis C, Preece R, Mock U, Qasim W. TCRalpha/beta/CD3 disruption enables CD3-specific antileukemic T cell immunotherapy. *JCI insight.* 2018; 3(13).
60. Torikai H, Reik A, Liu P-Q, Zhou Y, Zhang L, Maiti S, Huls H, Miller JC, Kebriaei P, Rabinovich B, et al. A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered

- to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. *Blood*. 2012; 119(24): 5697–705.
61. Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, Adams S, Amrolia P, Stafford S, Butler K, Rivat C, Wright G, Somana K, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med*. 2017; 9(374).
62. Tasian SK, Kenderian SS, Shen F, Ruella M, Shestova O, Kozlowski M, Li Y, Schrank-Hacker A, Morrissette JJD, Carroll M, et al. Optimized depletion of chimeric antigen receptor T cells in murine xenograft models of human acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017; 129(17): 2395–407.
63. Rafiq S, Hackett CS, Brentjens RJ. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020; 17(3): 147–67.
64. Bazarbachi AH, Al Hamed R, Labopin M, Afanasyev B, Hamladji R-M, Beelen D, Eder M, Scheid C, Wu D, Bunjes D, et al. Allogeneic stem-cell transplantation with sequential conditioning in adult patients with refractory or relapsed acute lymphoblastic leukemia: a report from the EBMT Acute Leukemia Working Party. *Bone Marrow Transplant*. 2020; 55(3): 595–602.
65. Poirot L, Philip B, Schiffer-Mannioui C, Le Clerre D, Chion-Sotinel I, Derniame S, Potrel P, Bas C, Lemaire L, Galetto R, et al. Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for “Off-the-Shelf” Adoptive T-cell Immunotherapies. *Cancer Res*. 2015; 75(18): 3853–64.
66. Wang D, Quan Y, Yan Q, Morales JE, Wetsel RA. Targeted Disruption of the beta2-Microglobulin Gene Minimizes the Immunogenicity of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Transl Med*. 2015; 4(10): 1234–45.
67. Maluski M, Ghosh A, Herbst J, Scholl V, Baumann R, Huehn J, Geffers R, Meyer J, Maul H, Eiz-Vesper B, et al. Chimeric antigen receptor-induced BCL11B suppression propagates NK-like cell development. *J Clin Invest*. 2019; 129(12): 5108–22.
68. Huang H-T, Su S-C, Chiou T-J, Lin Y-H, Shih Y-C, Wu Y-X, Fan T-H, Twu Y-C. DNA methylation-mediated Siglec-7 regulation in natural killer cells via two 5' promoter CpG sites. *Immunology*. 2020; 160(1): 38–51.
69. Weber EW, Maus M V, Mackall CL. The Emerging Landscape of Immune Cell Therapies. *Cell*. 2020; 181(1): 46–62.

70. Jacoby E. The role of allogeneic HSCT after CAR T cells for acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2019; 54(Suppl 2): 810–4.
71. Ligtenberg MA, Mougiakakos D, Mukhopadhyay M, Witt K, Lladser A, Chmielewski M, Riet T, Abken H, Kiessling R. Coexpressed Catalase Protects Chimeric Antigen Receptor-Redirected T Cells as well as Bystander Cells from Oxidative Stress-Induced Loss of Antitumor Activity. *J Immunol.* 2016; 196(2): 759–66.
72. Pearson ADJ, Rossig C, Lesa G, Diede SJ, Weiner S, Anderson J, Gray J, Georger B, Minard-Colin V, Marshall L V, et al. ACCELERATE and European Medicines Agency Paediatric Strategy Forum for medicinal product development of checkpoint inhibitors for use in combination therapy in paediatric patients. *Eur J Cancer.* 2020; 127: 52–66.
73. He X, Feng Z, Ma J, Ling S, Cao Y, Gurung B, Wu Y, Katona BW, O'Dwyer KP, Siegel DL, et al. Bispecific and split CAR T cells targeting CD13 and TIM3 eradicate acute myeloid leukemia. *Blood.* 2020; 135(10): 713–23.