

СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ CAR-T-ИММУНОТЕРАПИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЛИОБЛАСТОМЫ

Тимофеева С.В., Ситковская А.О., Новикова И.А., Ежова М.О.,
Лысенко Е.П., Кит О.И.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ,
г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Глиобластома остается наиболее распространенной и агрессивной первичной опухолью головного мозга на сегодняшний день. Из-за нейроанатомического расположения глиобластомы обычная химиотерапия и лучевая терапия имеют ограниченную эффективность у пациентов с этими опухолями. В течение последнего десятилетия противоопухолевая иммунотерапия получила широкое распространение среди современных терапевтических подходов. Значимость иммунотерапевтических методов заключается в их способности увеличивать эффективность лечения рака и предотвращать рецидивы путем усиления системного и локального иммунного ответа против опухолевых клеток.

Одним из наиболее перспективных направлений в современной иммунотерапии является CAR-T-терапия или адаптивная клеточная терапия с использованием генномодифицированных Т-лимфоцитов. Функциональное преимущество CAR-T-терапии заключается в ее способности генетически модифицировать лимфоциты, приводя к их активации *in vitro*.

В настоящем обзоре рассматриваются ключевые принципы CAR-T-терапии и анализируются опубликованные результаты клинических испытаний для лечения глиобластомы с использованием некоторых модификаций CAR-T-клеток.

Ключевые слова: CAR-T-терапия, глиобластома, клинические испытания, IL-13R α 2, HER2, EGFRvIII

RECENT ACHIEVEMENTS IN CAR-T CELL IMMUNOTHERAPY FOR GLIOBLASTOMA TREATMENT

Timofeeva S.V., Sitkovskaya A.O., Novikova I.A., Ezhova M.A.,
Lysenko E.P., Kit O.I.

National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Glioblastoma remains the most common and aggressive primary brain tumor today. Because of the neuroanatomical location of glioblastoma, conventional chemotherapy and radiation therapy have limited efficacy in patients with these tumors. Over the past decade, antitumor immunotherapy has become widespread

Адрес для переписки:

Тимофеева Софья Владимировна
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ
344037, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63.
Тел.: 8 (863) 300-02-00 (доб. 473).
E-mail: timofeeva.sophia@gmail.com

Address for correspondence:

Timofeeva Sofia V.
National Medical Research Centre for Oncology
344037, Russian Federation, Rostov-on-Don, 14th Line, 63.
Phone: 7 (863) 300-02-00 (acc. 473).
E-mail: timofeeva.sophia@gmail.com

Образец цитирования:

С.В. Тимофеева, А.О. Ситковская, И.А. Новикова,
М.О. Ежова, Е.П. Лысенко, О.И. Кит «Современные
достижения CAR-T-иммунотерапии для лечения
глиобластомы» // Медицинская иммунология, 2021.
Т. 23, № 3. С. 483-496.
doi: 10.15789/1563-0625-RAI-2111
© Тимофеева С.В. и соавт., 2021

For citation:

S.V. Timofeeva, A.O. Sitkovskaya, I.A. Novikova,
M.A. Ezhova, E.P. Lysenko, O.I. Kit "Recent achievements
in CAR-T cell immunotherapy for glioblastoma treatment",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2021, Vol. 23, no. 3, pp. 483-496.
doi: 10.15789/1563-0625-RAI-2111
DOI: 10.15789/1563-0625-RAI-2111

among modern therapeutic approaches. The importance of immunotherapeutic methods lies in their ability to increase the effectiveness of cancer treatment and prevent relapses by enhancing the systemic and local immune response against tumor cells.

One of the most promising directions in modern immunotherapy is CAR-T therapy, or adoptive cell therapy using genetically modified T-lymphocytes. The functional advantage of CAR-T therapy is its ability to genetically modify lymphocytes, leading to their activation *in vitro*.

This review examines the key principles of CAR-T therapy and analyzes the published results of clinical trials for the treatment of glioblastoma using several modifications of CAR-T cells.

Keywords: CAR-T therapy, glioblastoma, clinical trials, IL-13R α 2, HER2, EGFRvIII

Введение

Использование адоптивно перенесенных Т-клеток в качестве противоракового терапевтического средства является концепцией, которая широко исследуется в течение последних десятилетий. Методы терапии лимфокин-активированными киллерами (ЛАК) и туморинфильтрующими лимфоцитами (ТИЛ), разработанные группой исследователей во главе с Розенбергом в 1980 году, стали предпосылкой для применения CAR-T-терапии [48]. Недостатком ЛАК терапии является ее неспецифичность, поэтому были сгенерированы клетки для CAR-T-терапии, в основе которой лежит создание опухоль-специфичных цитотоксичных лимфоцитов путем внесения трансгена *ex vivo*, кодирующего химерный антигенный рецептор (CAR, chimeric antigen receptor) [1].

CAR-T-терапия в последние несколько лет продемонстрировала многообещающие результаты в лечении гематологических злокачественных опухолей. Уровень ремиссии снизился до 80% у больных с В-клеточными лимфомами, неходжкинскими лимфомами и в особенности в случае В-линейного острого лимфобластного лейкоза [6, 15, 19, 33, 37]. Однако применение CAR-T-клеток в лечении солидных опухолей затруднено из-за ряда факторов, таких как малая эффективность миграции CAR-T-клеток в ткань опухоли, иммуносупрессивное микроокружение, а также ограниченное количество специфических антигенов [40, 42].

Одной из наиболее распространенных и агрессивных опухолей мозга является глиобластома. Большинство современных методов лечения неспецифичны и могут воздействовать не только на опухолевые клетки, но и на неповрежденные клетки мозга. Напротив, CAR-T-терапия может точно воздействовать на опухоль, увеличивая длительность противоопухолевого эффекта [49, 52].

По данным Clinical Trials, зарегистрировано 29 действующих клинических исследований CAR-T-терапии у пациентов с диагностированной глиобластомой. Все исследования находятся на ранней стадии испытаний, однако на сегод-

няшний день опубликованы предварительные результаты с использованием нескольких вариантов CAR для модификации Т-лимфоцитов при данном заболевании.

В данном обзоре мы рассмотрим основные принципы CAR-T-терапии и опубликованные результаты клинических испытаний различных модификаций CAR-T-клеток для лечения глиобластомы, а также иммуносупрессивные барьеры и факторы, ограничивающие эффективность противоопухолевых CAR-T-клеток.

Химерный антигенный рецептор (CAR). Доменная структура

Химерная природа рецепторов обусловлена сочетанием в одном и том же рецепторе функций активации Т-клеток и специфического связывания с антигенами. Впервые синтетические иммунные рецепторы CAR были разработаны более 25 лет назад для перенаправления эффекторной функции Т-клеток. Генетические модификации CAR экспрессируются на поверхности Т-клеток, что позволяет им напрямую распознавать ассоциированный с опухолью антиген независимо от молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) [16].

Стандартная конструкция CAR, как правило, состоит из внеклеточного домена (эктодомен), трансмембранного домена и домена внутриклеточной активации Т-клеток (энтодомен) [14].

Внеклеточный связывающий домен обычно состоит из одноцепочечных переменных фрагментов scFv (single chain variable fragment), включающих переменные области легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей, ковалентно связанных линкером [36]. Тем не менее в доклинических испытаниях были созданы альтернативные связывающие домены, включая лиганды, физиологические рецепторы, пептиды, нанотела (однодоменные антитела (VHHs) и DARPins (разработанные анкириновые повторные белки) [22, 27, 34, 43, 54]. Эти последовательности отвечают за специфичность CAR и аффинность связывания с антигеном-мишенью.

Эктодомен связан гибким шарнирным фрагментом с трансмембранным доменом, который

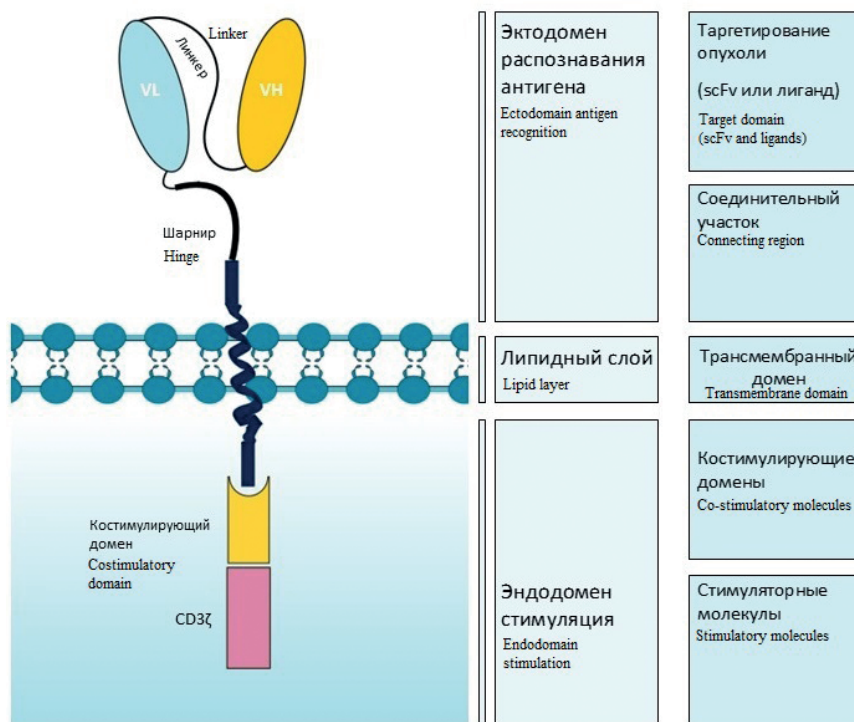


Рисунок 1. Структура химерного антигенного рецептора (CAR)

Figure 1. Structure of the chimeric antigen receptor (CAR)

необходим для закрепления химерного рецептора на поверхности Т-лимфоцита [36].

Внутриклеточный сигнальный домен включает в себя костимулирующие домены, которые могут быть включены в конструкцию (CAR CD28, 4-1BB, CD27, ICOS и/или OX40) и дополнительно активируют работу Т-лимфоцитов, продлевая срок их жизни в организме больного (рис. 1) [55].

За годы исследований было создано несколько поколений CAR на основе стандартной конфигурации.

CAR первого поколения объединяли антигенсвязывающую часть scFv с сигнальным доменом в форме CD3z η FcR γ [16]. Конструкцию CAR второго поколения дополняли костимулирующим доменом (т.е. CD28, 4-1BB, OX-40), а в CAR третьего поколения включали еще один дополнительный костимулирующий домен. Новые конструкции химерных рецепторов антигенов были модифицированы по ряду причин, в том числе и для усиления их активности против опухолевых клеток [8, 11, 39, 58]. Совсем недавно появились CAR четвертого поколения, также называемые Т-клетками TRUCK, которые дополнены стимулирующими цитокинами, включая IL-12, IL-15, IL-18, противодействующими иммуносупрессивному микроокружению солидных опухолей [13]. Эволюция модификации химер-

ного антигенного рецептора CAR представлена на рисунке 2.

Теоретически такое доменное строение рецептора позволяет модифицировать CAR-T-клетки против любой опухоли. При распознавании мишени химерным антигенным рецептором происходит первичная активация Т-лимфоцитов с высвобождением цитокинов, цитолитической дегрануляцией и последующей пролиферацией Т-клеток, что приводит к длительному противоопухолевому ответу [12]. Тем не менее некоторые солидные опухоли, в том числе глиобластома, обладают гетерогенностью и иммуносупрессивной средой, что на практике может затруднить поиск мишени [44].

Способы получения CAR-T-клеток

Несмотря на различные модификации конструкций химерных антигенных рецепторов, процесс создания CAR-T-клеток включает однотипные этапы: сбор и обработку источника Т-клеток; отбор и/или активацию Т-клеток; генетическую модификацию с помощью кДНК CAR; экспансию и формирование пула модифицированных Т-клеток (рис. 3) [56].

Первым этапом производства CAR-T-клеток является выделение мононуклеарных клеток периферической крови у пациента при условии достаточного количества Т-лимфоцитов, ориен-

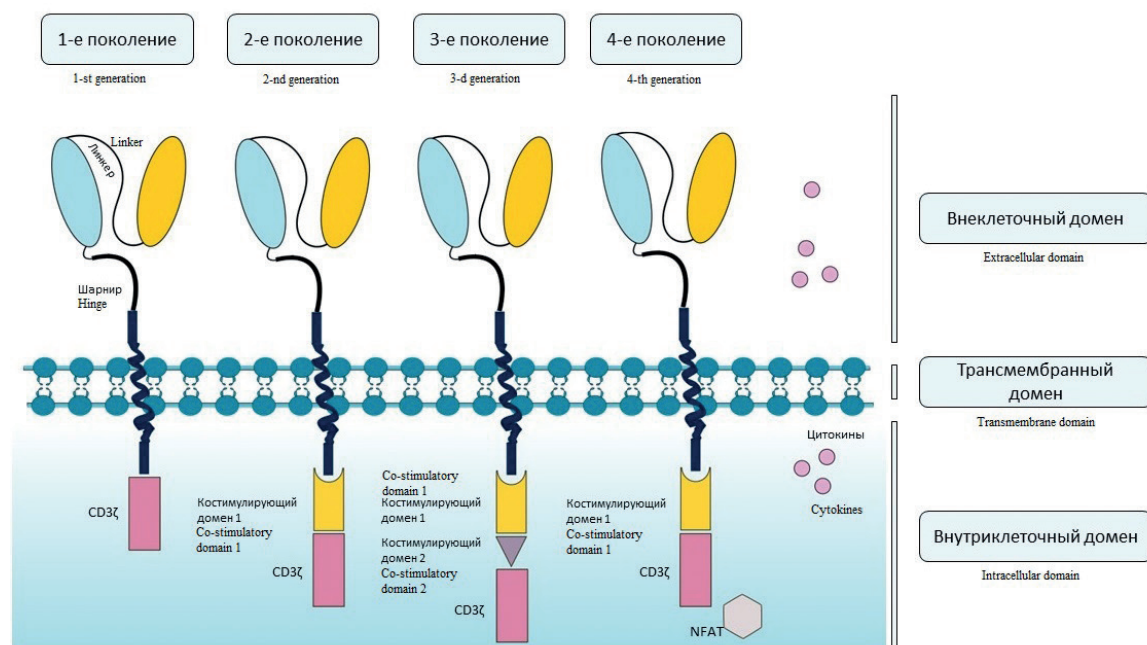


Рисунок 2. Эволюция модификации химерного антигенного рецептора (CAR)

Figure 2. Evolution of a chimeric antigen receptor (CAR) modification

тировочно около 100×10^6 клеток. Исследования разных лабораторий показали, что определенные субпопуляции Т-клеток могут демонстрировать функциональные преимущества [4, 18, 25]. Существует ряд протоколов, в которых перед этапом стимуляции выделяют некоторые субпопуляции лимфоцитов методами иммуномагнитной селекции либо проводят деплецию моноцитов путем адгезии или элютриации для обогащения лимфоцитов и для снижения риска загрязнения материала нежелательными продуктами лейкофереза [45].

Вторым этапом является активация Т-клеток, необходимая для последующих этапов экспансии и трансдукции кДНК химерного антигенного рецептора ленти- или ретровирусами. Широко используется метод активации с применением парамагнитных гранул, покрытых моноклональными антителами к CD3-биотину, CD28 и антибиотину в присутствии цитокинов [33]. Кроме этого, существуют другие подходы для активации Т-клеток, такие как использование антигенпрезентирующих клеток пациентов [29], полимерные наноматрицы с антителами к CD28/CD3 [10], а также технологию Exmager [17, 38].

Третий этап заключается в создании генетической модификации Т-лимфоцитов. Генетические модификации Т-клеток CAR продемонстрировали существенное влияние на их функцию

и эффективность, о чем первоначально свидетельствует вставка костимулирующих доменов в конструкцию первого поколения. Современные методы CAR-T-терапии в значительной степени основаны на стабильной экспрессии CAR при доставке вирусными и невирусными системами переноса генов. Существует несколько основных подходов, используемых для клинического применения: γ -ретровирусные векторы, лентивирусные векторы система транспозон/транспозаза, а также альтернативный способ доставки мРНК методом электропорации, в результате которого достигается временная экспрессия химерного рецептора [7, 41, 51, 56].

Четвертым этапом является экспансия Т-клеток. В зависимости от стратегии модификации клеток CAR-T есть несколько платформ экспансии для генерации терапевтических доз CAR-T-клеток. Академические центры и биотехнологические компании чаще всего используют биореакторы GE WAVE [26]. Система биореактора автоматически перемешивает клетки, поддерживает температуру, газовый состав воздуха и позволяет нарастить до 10^7 клеток в мл. Другая система Prodigy (Miltenyi Biotec) нацелена на полную интеграцию и автоматизацию сложных многоэтапных процедур обработки и изготовления клеток CAR-T, используется для магнитного разделения и культивирования клеток, а так-

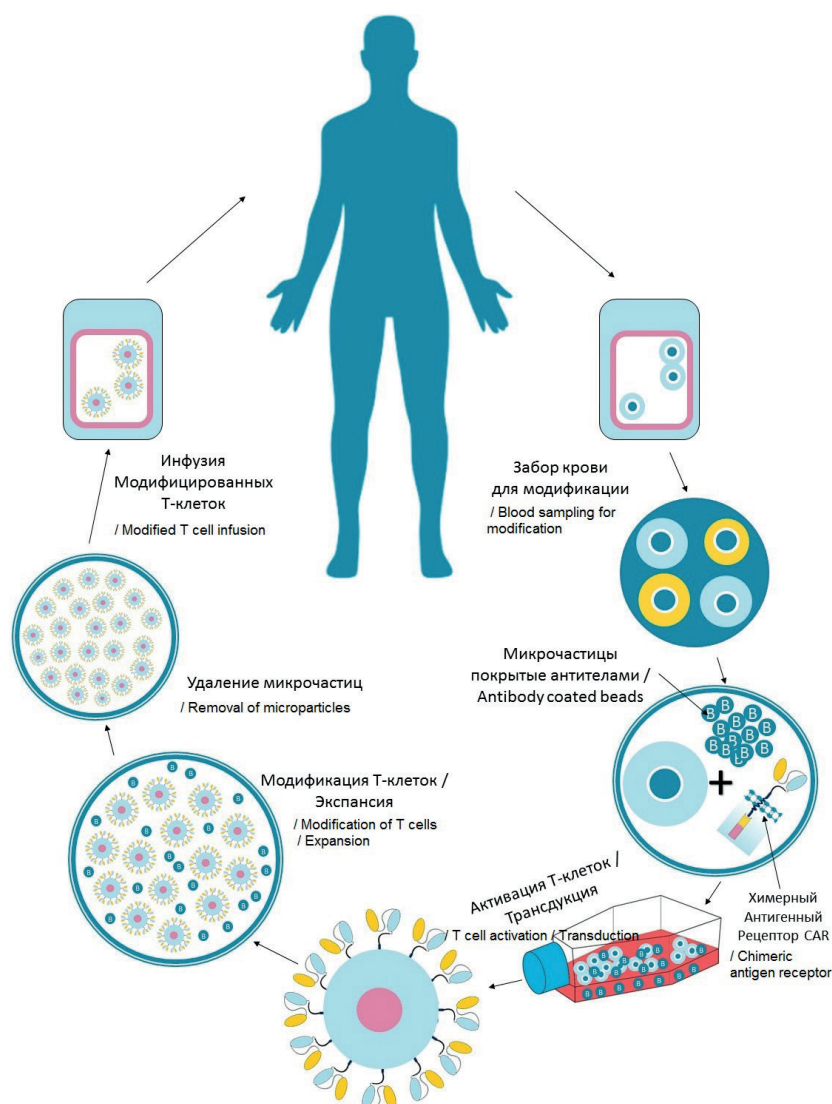


Рисунок 3. Основные этапы процесса производства химерных антигенных рецепторных Т-клеток

Figure 3. Main stages of the production process of chimeric antigenic receptor T cells

же поддерживает лентивирусную трансдукцию Т-клеток с помощью CAR [32].

Другим способом является экспансия клеток с помощью многократной стимуляции антиген-презентирующими клетками. Экспансия CAR-T-клеток, генерируемых системой транспозон/транспозаза, основанная на селективном размножении при многократной стимуляции γ -облученными антиген-презентирующими клетками в присутствии IL-2 и IL-21 [53]. Генетически модифицированные клетки линии K562 для экспрессии CD32, CD64, CD86, CD137 и IL-15 в настоящее время используются для до-

клинических испытаний CD19-специфических CAR-T-клеток [51].

Завершающим этапом является контроль качества, полученного продукта на безопасность, чистоту и активность CAR-T-клеток [24].

Клинические испытания CAR-T-терапии у пациентов с глиобластомой

Клинические испытания, связанные с введением анти-CD19 CAR-T-клеток, достигли беспрецедентного успеха при терапии рефрактерных форм лимфомы, так как адресное воздействие анти-CD19-аутологических клеток вызвало полную регрессию опухолевых клеток у пациентов. После двух циклов терапии противоопухоле-

вый эффект сохранялся на протяжении четырех лет [30]. Однако в солидных опухолях обычно отсутствуют общие или специфические поверхностные антигены, что существенно усложняет применение модифицированных CAR-T-клеток для терапии глиальных опухолей.

Несмотря на довольно большое количество зарегистрированных клинических испытаний, достоверных результатов по выбору стратегии лечения определенными модификациями CAR не удалось достичь. Большинство из них не прошло оценку на безопасность и биологическую активность, лишь у единичного количества пациентов был установлен полный или частичный ответ на CAR-T-терапию.

IL-13R α 2

Одно из первых клинических исследований безопасности, модифицированных T-клеток, направленных на IL-13R α 2 (рис. 4А), проводилось на трех пациентах с диагнозом рецидивирующая глиобластома (NCT01975701). Пациентам вводили дозы аутологичных CD8⁺T-клеток через имплантированную систему резервуар/катетер в правый бок левого желудочка. Исследование продемонстрировало для всех пациентов высокую степень переносимости повторных интракраниальных инфузий, а также молекулярную и рентгенографическую биоактивность.

На основании этих результатов было запущено клиническое исследование I фазы (NCT02208362) с использованием модифицированных IL-13R α 2 CAR-T-клеток для усиления противоопухолевой активности и устойчивости T-клеток в центральной нервной системе. Отчет об одном из пациентов, получившем инфузию CAR-T-клеток интракраниально, свидетельствовал о полной регрессии всех внутрочерепных и спинальных опухолей на протяжении 7,5 месяцев после начала лечения. Кроме того, на протяжении терапии не было выявлено никаких признаков интоксикации. Однако, согласно отчету испытания, на 228-й день после начала лечения CAR-T-клетками опухоль рецидивировала. Причина этого рецидива опухоли в настоящее время изучается, предварительные результаты свидетельствуют о снижении экспрессии IL-13R α 2 [9].

Команда исследователей из Стенфордского университета разработала конструкцию CAR-T-IL-13 зетактин, в основе которой использовали генетически модифицированные аутологичные T-лимфоциты, экспрессирующие CAR IL-13 зетактин, нацеленный на IL-13R α + глиобластома и вирус простого герпеса тимидинкиназы 1-типа (HSV1-tk) в качестве репортерного гена, экспрессию которого можно отслеживать в присутствии фтор-3-гидроксиметил-бутил-гуанина (FHBG). Пациентам (n = 7) с диагнозом прогрессирующая

глиобластома и сверхэкспрессией рецептора IL-13R α 2 интракраниально вводили IL-2. Пациенты 1 и 2 получали аутологичные CAR-T-клетки (NCT00730613), тогда как пациенты 3-7 получали аллогенные CAR-T-клетки (NCT01082926). После инфузии CAR-T побочных эффектов или повреждений нормальной ткани не наблюдалось. Ни один пациент не получал дополнительную радиотерапию или химиотерапию в течение всего этого исследования. При визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии в присутствии FHBG обнаружено повышение активности CAR-T-клеток и противоопухолевый эффект, который, однако, не был длительным [28].

HER2

В эксперименте на доклинических моделях ксенотрансплантата, полученных от пациентов с глиобластомой, было показано, что геномодифицированные лимфоциты, экспрессирующие на поверхности HER2, обладают мощной противоопухолевой активностью, так как способны уничтожить как клетки, составляющие основной объем опухоли, так и клетки, инициирующие ее [3].

В I фазу клинического испытания (NCT 01109095) с применением CAR-T-клеток HER2 (рис. 4Б) было включено 17 пациентов с диагнозом прогрессирующая глиобластома. Для оценки статуса заболевания до инфузии T-клеток всем пациентам проводили визуальный анализ с помощью компьютерной томографии, магнитно-резонансной томографии и/или позитронно-эмиссионной томографии. Пациенты, согласно модифицированному методу непрерывной переоценки для определения максимально переносимой дозы, получали восемь типов доз HER2-CAR-T-клеток по нарастающей (от 1×10^6 до 1×10^8 /м²). Образцы периферической крови исследовали до и после инфузии для оценки уровня токсичности и экспансии T-клеток. Клинический ответ на воздействие HER2-CAR-T-клеток оценивали с помощью МРТ головного мозга через 6 недель после первой инфузии T-клеток. У 7 пациентов наблюдалась стабилизация заболевания длительностью от 8 до 29 месяцев и у одного пациента частичный ответ на терапию. Медиана общей выживаемости для 8 больных после постановки диагноза составила 11,1 месяца после начала инфузий CAR-T-клетками и 24,5 месяца после постановки диагноза, и в целом пациенты не имели серьезных побочных эффектов. По результатам количественного анализа qPCR мононуклеаров периферической крови у больных не удалось обнаружить доказательства постинфузионной экспансии HER2-CAR-T-клеток, тем не менее у двух пациентов клетки сохранялись в ор-

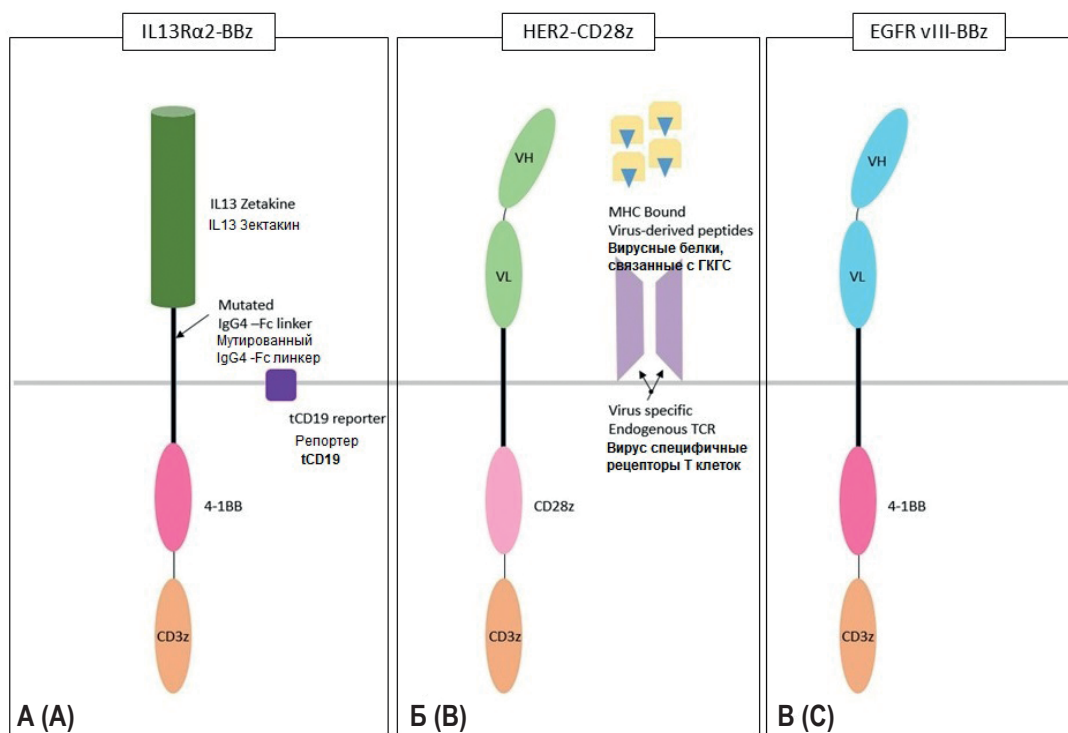


Рисунок 4. Основные химерные антигенные рецепторы для CAR-T-терапии глиальных опухолей

Figure 4. Main chimeric antigen receptors for CAR-T therapy of glial tumors

ганизме на протяжении 12 месяцев без побочных эффектов [5].

EGFRvIII

Значительные успехи были продемонстрированы в доклинических иммунизированных мышинных моделях с применением EGFRvIII (рис. 4B) CAR-T-клеток для иммунотерапии глиобластомы. Rosenberg S. и его коллеги разработали конструкцию EGFRvIII CAR третьего поколения с использованием scFv из клона антител (mAb139) и внутриклеточного сигнального домена из CD28, 4-1BB и CD3z. Клетки EGFRvIII CAR-T, введенные через хвостовую вену, демонстрировали длительную персистенцию *in vivo* [50]. Для определения в эксперименте на мышах терапевтического эффекта EGFRvIII CAR-T-клеток в контексте стандартной терапии для глиобластомы, Рикконе и др. первым этапом индуцировали лимфопению с помощью темозоломида и тотального облучения мозга, а затем вводили EGFRvIII CAR-T-клетки. В результате наблюдался рост клонального размножения адоптивно перенесенных клеток и усиление общего противоопухолевого ответа [47].

Пилотное клиническое испытание (NCT 01454596) было разработано для определения максимальной безопасной дозы третьего поколения ретровирусно трансдуцированных EGFRvIII CAR-T-клеток, а также для определения влияния на выживаемость без прогрессирования заболевания у пациентов (n = 18) с рецидивирующей глиобластомой. Первым этапом лечения была химиотерапия: два дня циклофосфида (60 мг/кг) и пять дней флударабина (25 мг/м²), а затем проводилась тридцатиминутная EGFRvIII CAR-T инфузия. Реакцию опухоли оценивали с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) каждые 28 дней, однако объективных ответов не обнаружено. Менее чем через три месяца после EGFRvIII CAR-инфузий опухоль прогрессировала у 16 из 18 пациентов. При усилении симптомов проводили терапию бевацизумабом (n = 3), резекцию (n = 1) или паллиативную помощь (n = 7, медиана выживаемости после прогрессирования 1,2 месяца, диапазон 0,4-3,5). Несмотря на то, что у большинства пациентов наблюдалась специфическая потеря или снижение экспрессии EGFRvIII в резецированных опухолях после

инфузии CAR-T-клеток, не было ни регрессии опухоли, ни торможения прогрессирования или повышения выживаемости среди пациентов, и, кроме того, из-за возникших побочных эффектов в виде неврологических симптомов и осложнений с легкими, испытание не смогло перейти на вторую фазу. Таким образом, в данном исследовании не удалось установить клиническую эффективность EGFRvIII CAR-T-терапии [2].

В настоящее время, по данным Clinical Trials, продолжаются 14 клинических испытаний с использованием CAR-T-клеток для лечения глиобластомы (табл. 1).

Большинство из этих CAR-T-клеток нацелены на EGFR, HER2 или IL-13R α 2 и на некоторые новые мишени, такие как GD2, EphA2, MUC1 и CD147, также включенные в текущие исследования.

Проблемы при использовании CAR-T-терапии для лечения глиобластомы

Ограниченное количество высокоспецифичных мишеней на поверхности клетки является одной из основных причин отсутствия эффективности при CAR-T-терапии солидных опухолей.

CAR-T-клетки, попадая в опухоль, как показано на рисунке 4, сталкиваются с множеством препятствий в ее микроокружении, включая цитокины, иммуносупрессивные вещества, физические барьеры и метаболические факторы (рис. 5) [40].

Важную роль в иммуносупрессии играют макрофаги, в частности посредством стимуляции стволовых клеток глиомы через усиление передачи внутриклеточных сигналов митоген-активируемой протеинкиназы MAPK [59].

Имуносупрессивное окружение глиобластомы включает в себя цитокины IL-6, IL-10 и TGF- β , регуляторные клетки (Tregs), а также лиганды ингибиторов контрольных точек, каждые из которых подавляют эффекторную активность и пролиферацию T-клеток [23]. Опухоль-ассоциированные макрофаги, микроглия и миелоидные клетки-супрессоры (MDSC) также распространены в глиобластоме и поддерживают рост опухолевых клеток [40].

Еще одной причиной потери антиген-специфичности является гетерогенность опухоли [46]. Важность пространственной гетерогенности описана в результатах многочисленных, локально отличных постинфузионных биопсий, взятых у одного субъекта, получавшего EGFRvIII CAR-T-клетки. Степень экспрессии EGFRvIII существенно варьировала в разных областях опухоли, что указывало либо на то, что CAR-T-клетки обладали различной степенью эффективности в разных местах опухоли, либо, что более вероятно,

базовая экспрессия EGFRvIII до обработки была пространственно неоднородной [20].

Ни один из антигенов-мишеней CAR не является универсально экспрессируемым. Данные доклинических и клинических исследований показали, что нацеливание на один антиген приводит к снижению регуляции таргетного антигена и последующему рецидиву опухоли [9, 31].

Стратегии модификации CAR-T-клеток при терапии глиобластомы

С целью преодоления ингибирующих сигналов разрабатывается целый спектр решений, потенциально способных увеличить эффективность терапии в неблагоприятных условиях иммуносупрессивного микроокружения [44].

Одной из стратегий преодоления иммуносупрессивного воздействия является комбинированная терапия CAR-T-клетками с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа, например PD-1, для предотвращения «истощения» T-клеток [21, 57].

Еще одним решением может стать модификация трансгенов для избыточной экспрессии гомеостатических цитокинов. В исследованиях глиобластомы модифицировали IL-13R α 2 CAR-T-клетки для сверхэкспрессии трансгенного IL-15. Секреция IL-15 зависела от активации T-клеток и вызывала улучшение персистенции CAR-T-клеток *in vitro*, тем самым инициировав противоопухолевую активность *in vivo*. Тем не менее этот эффект не был длительным [31].

Другая возможная стратегия – это мультиантигенный таргетинг. Разработка высокоэффективных лентивирусных и ретровирусных векторов позволила встраивать более крупные конструкции, содержащие несколько генов, в геном T-клеток. В США была разработана конструкция трехвалентных CAR-T-клеток, в которой на поверхности T-клеток экспрессируют сразу три антиген-специфичных фрагмента HER2, IL-13R α 2- и EphA2 [57]. Результаты исследования показали, что конструкция мультиантигенных CAR-T-клеток способна эффективно лизировать клетки глиомы *in vitro* и проявляет более высокую противоопухолевую активность *in vivo* по сравнению с предыдущими конфигурациями CAR. Важно отметить, что использование HER2-IL-13R α 2-EphA2 CAR-T-клеток привело к отсутствию рецидива опухоли при более низких дозах T-клеток, как было показано на примере 2 аутологичных моделей: *in vitro* на первичных образцах глиобластомы, полученных после хирургических резекций, и *in vivo* на ортотопической PDX модели [28].

В дополнение к модификации конструкций CAR, новые стратегии используют преимущества более целенаправленных технологий ре-

ТАБЛИЦА 1. ТЕКУЩИЕ КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ CAR-T-ТЕРАПИИ ПРИ ГЛИАЛЬНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

TABLE 1. CURRENT CLINICAL TRIALS OF CAR-T THERAPY FOR GLIAL TUMOR TREATMENT

Антиген Antigen	Номер исследования Study number	Вмешательство Intervention	Заболевание Cancer type	Фаза Phase	Первичные результаты Primary results
EGFR	NCT01454596	EGFRvIII CAR ЛПК, альдеслейкин, флудара- бин, циклофосфамид EGFRvIII CAR PBL, aldesleukin, fludarabine, cyclophosphamide	Глиома, опухоль ЦНС Glioma, CNS tumor	1, 2	ПЭСЛ, ВПЗ SEAWT, PFS
	NCT03638167	EGFR806 CAR-T	Глиома, опухоль ЦНС Glioma, CNS tumor	1	ПЭСЛ SEAWT
	NCT03283631	EGFRvIII CAR-T	ГБМ, ГСМ GBM, GSM	1	МПД MTD
	NCT03726515	EGFRvIII CAR-T, Пембролизумаб EGFRvIII CAR-T, Pembrolizumab	ГБМ GBM	1	ПЭСЛ SEAWT
	NCT02664363	EGFRvIII CAR-T	ГБМ, ГСМ GBM, GSM	1	МПД MTD
	NCT03389230	EGFR CAR-T	Глиома Glioma	1	ПЭСЛ SEAWT
HER2	NCT03500991	HER2 CAR-T	Глиома, опухоль ЦНС Glioma, CNS tumor	1	ПЭСЛ SEAWT
IL-13R α 2	NCT04003649	IL-13R α 2 CAR-T + ниволу- маб + ипилимумаб или ни- волумаб + IL-13R α 2 CAR-T IL-13R α 2 CAR-T + nivolumab + ipilimumab or nivolumab +IL-13R α 2 CAR-T	ГБМ, ГСМ GBM, GSM	1	ТОД, СВЦ DLT, CRS
	NCT02208362	IL-13R α 2 CAR-T	Глиома, опухоль ЦНС Glioma, CNS tumor	1	ТОД DLT
CD147	NCT04045847	CD147 CAR-T	ГБМ GBM	1	ПЭСЛ SEAWT
GD2	NCT03252171	GD2 CAR-T	Глиома Glioma	1, 2	Общий ответ General answer
	NCT04099797	GD2 CAR-T, циклофосфа- мид, флударабин GD2 CAR-T, cyclophosphamide, fludarabine	Глиома Glioma	1	ТОД DLT
EphA2	NCT02575261	EphA2 CAR-T	Глиома Glioma	1, 2	Объем опу- холи Tumor volume
B7-H3	NCT04077866	TMZ + B7-H3 CAR-T VS TMZ + Плацебо TMZ + B7-H3 CAR-T VS TMZ + Placebo	ГБМ GBM	1, 2	ОБ, ВПЗ OS, PFS

Примечание. ЛПК – лимфоциты периферической крови; ПЭСЛ – побочные эффекты, связанные с лечением; ВПЗ – выживаемость без прогрессирования заболевания; ЦНС – центральная нервная система; ГБМ – глиобластома; ГСМ – глиосаркома; МПД – максимальная переносимая доза; ТОД – токсичность, ограничивающая дозу; СВЦ – синдром высвобождения цитокинов; ОБ – общая выживаемость.

Note. PBL, peripheral blood lymphocytes; SEAWT, side effects associated with treatment; PFS, progression-free survival; CNS, central nervous system; GBM, glioblastoma; GSM, gliosarcoma; MTD, maximum tolerated dose; DLT, dose limiting toxicity; CRS, cytokine release syndrome; OS, overall survival.

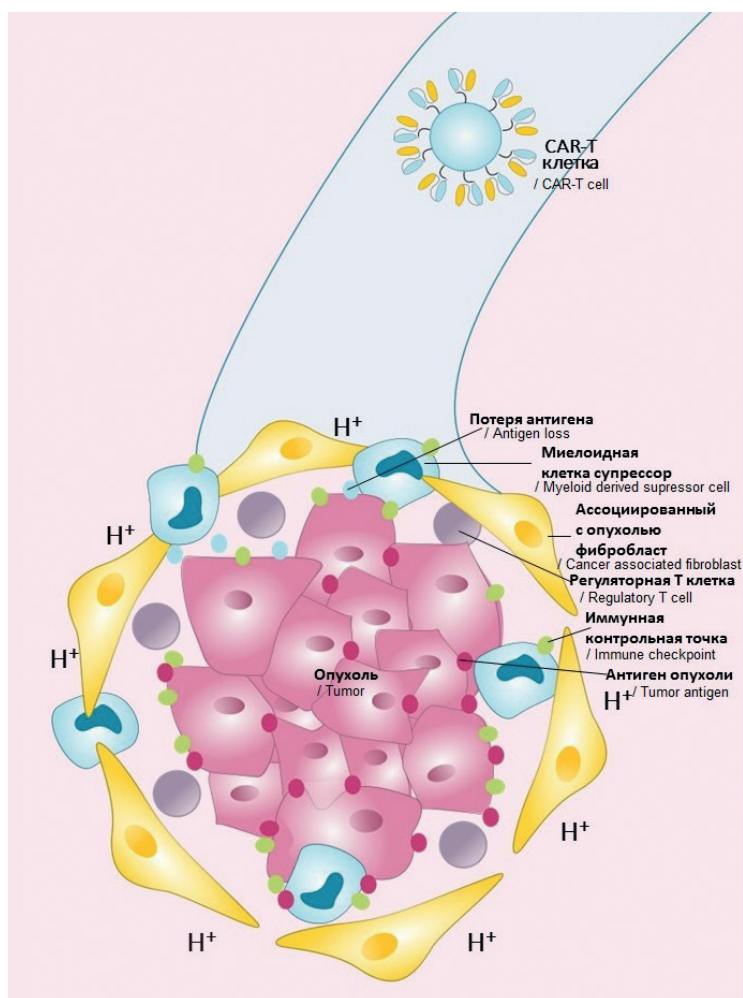


Рисунок 5. Иммуносупрессивное микроокружение опухоли

Figure 5. Immunosuppressive tumor microenvironment

дактирования генов, таких как системы TALEN и CRISPR/Cas9, для модификации генома Т-клеток. Каждая из этих технологий уже внесла свой вклад в разработку генно-модифицированных CAR-T-клеток следующего поколения, которые в скором времени продемонстрируют возможные улучшения по сравнению с текущим поколением CAR-T-клеток в клинической практике [35].

Кроме того, проводятся активные исследования, направленные на более глубокое понимание состава и формирования микроокружения опухоли, включая цитокины и молекулы, ингибирующие иммунный ответ [46].

Множественные стратегии, такие как вставка цитокиновых трансгенов, нокаут гена, нокаунт гена, контроль экспрессии и активности CAR, а также одновременное таргетирование против нескольких антигенов, имеют огромный потенциал в CAR-T-клеточной терапии глиомы. Тем не менее выбор наиболее эффективной стратегии

потребуется значительного увеличения доклинических испытаний.

Заключение

На сегодняшний день, несмотря на разнообразие использованных модификаций и способов доставки CAR, ни одно из клинических испытаний CAR-T-терапии при глиобластоме не продемонстрировало длительного противоопухолевого эффекта. Наиболее перспективной стратегией является применение CAR-T-клеток в составе комбинированной терапии, которая способна обеспечить одновременное или последовательное устранение основных факторов, препятствующих эффективному и безопасному воздействию CAR-T-терапии для лечения глиобластомы.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы / References

1. Павлова А.А., Масчан М.А., Пономарев В.Б. Адоптивная иммуноterapia генетически модифицированными Т-лимфоцитами, экспрессирующими химерные антигенные рецепторы // Онкогематология, 2017. Т. 12, № 1. С. 17-32. [Pavlova A.A., Maschan M.A., Ponomarev V.B. Adoptive immunotherapy with genetically engineered T lymphocytes modified to express chimeric antigen receptors. *Onkogematologiya = Oncohematology*, 2017, Vol. 12, no. 1, pp. 17-32. (In Russ.)]
2. Ahmed N., Brawley V., Hegde M., Bielamowicz K., Kalra M., Landi D., Robertson C., Gray T.L., Diouf O., Wakefield A., Ghazi A., Gerken C., Yi Z., Ashoori A., Wu M.F., Liu H., Rooney C., Dotti G., Gee A., Su J., Kew Y., Baskin D., Zhang Y.J., New P., Grilley B., Stojakovic M., Hicks J., Powell S.Z., Brenner M.K., Heslop H.E., Grossman R., Wels W.S., Gottschalk S. HER2-specific chimeric antigen receptor-modified virus-specific T Cells for progressive glioblastoma: a phase 1 dose-escalation trial. *JAMA Oncol.*, 2017, Vol. 3, no. 8, pp. 1094-1101.
3. Ahmed N., Salsman V.S., Kew Y., Shaffer D., Powell S., Zhang Y.J., Grossman R.G., Heslop H.E., Gottschalk S. HER2-specific T cells target primary glioblastoma stem cells and induce regression of autologous experimental tumors. *Clin. Cancer Res.*, 2010, Vol. 16, no. 2, pp. 474-485.
4. Berger C., Jensen M.C., Lansdorp P.M., Gough M., Elliott C., Riddell S.R. Adoptive transfer of effector CD8⁺ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. Version 2. *J. Clin. Invest.*, 2008, Vol. 118, no. 1, pp. 294-305.
5. Bielamowicz K., Fousek K., Byrd T.T., Samaha H., Mukherjee M., Aware N., Wu M.F., Orange J.S., Sumazin P., Man T.K., Joseph S.K., Hegde M., Ahmed N. Trivalent CAR T cells overcome interpatient antigenic variability in glioblastoma. *Neuro Oncol.*, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 506-518.
6. Brentjens R.J., Davila M.L., Riviere I., Park J., Wang X., Cowell L.G., Bartido S., Stefanski J., Taylor C., Olszewska M., Borquez-Ojeda O., Qu J., Wasielewska T., He Q., Bernal Y., Rijo I.V., Hedvat C., Kobos R., Curran K., Steinherz P., Jurcic J., Rosenblat T., Maslak P., Frattini M., Sadelain M. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.*, 2013, Vol. 5, no. 177, 177ra38. doi:10.1126/scitranslmed.3005930.
7. Brentjens R.J., Latouche J.B., Santos E., Marti F., Gong M.C., Lyddane C., King P.D., Larson S., Weiss M., Riviere I., Sadelain M. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes costimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat. Med.*, 2003, Vol. 9, no. 3, pp. 279-286.
8. Brentjens R.J., Santos E., Nikhamin Y., Yeh R., Matsushita M., La Perle K., Quintás-Cardama A., Larson S.M., Sadelain M. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clin. Cancer Res.*, 2007, Vol. 13, no. 18, Pt 1, pp. 5426-5435.
9. Brown C.E., Alizadeh D., Starr R., Weng L., Wagner J.R., Naranjo A., Ostberg J.R., Blanchard M.S., Kilpatrick J., Simpson J., Kurien A., Priceman S.J., Wang X., Harshbarger T.L., D'Apuzzo M., Ressler J.A., Jensen M.C., Barish M.E., Chen M., Portnow J., Forman S.J., Badie B. Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-Cell therapy. *N. Engl. J. Med.*, 2016, Vol. 375, no. 26, pp. 2561-2569.
10. Casati A., Varghaei-Nahvi A., Feldman S.A., Assenmacher M., Rosenberg S.A., Dudley M.E., Scheffold A. Clinical-scale selection and viral transduction of human naïve and central memory CD8⁺ T cells for adoptive cell therapy of cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2013, Vol. 62, no. 10, pp. 1563-1573.
11. Carpenito C., Milone M.C., Hassan R., Simonet J.C., Lakhai M., Suhoski M.M., Varela-Rohena A., Haines K.M., Heitjan D.F., Albelda S.M., Carroll R.G., Riley J.L., Pastan I., June C.H. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2009, Vol. 106, no. 9, pp. 3360-3365.
12. Chen D., Yang J. Development of novel antigen receptors for CAR T-cell therapy directed toward solid malignancies. *Transl. Res.*, 2017, Vol. 187, pp. 11-21.
13. Chmielewski M., Kopecky C., Hombach A.A., Abken H. IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively Muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression. *Cancer Res.*, 2011, Vol. 71, no. 17, pp. 5697-5706.
14. Dai H., Wang Y., Lu X., Han W. Chimeric antigen receptors modified T-Cells for cancer therapy. *J. Natl Cancer Inst.*, 2016, Vol. 108, no. 7, djv439. doi: 10.1093/jnci/djv439.
15. Davila M.L., Riviere I., Wang X., Bartido S., Park J., Curran K., Chung S.S., Stefanski J., Borquez-Ojeda O., Olszewska M., Qu J., Wasielewska T., He Q., Fink M., Shinglot H., Youssif M., Satter M., Wang Y., Hosey J., Quintanilla H., Halton E., Bernal Y., Bouhassira D.C., Arcila M.E., Gonen M., Roboz G.J., Maslak P., Douer D., Frattini M.G., Giralto S., Sadelain M., Brentjens R. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.*, 2014, Vol. 6, no. 224, 224ra25. doi: 10.1126/scitranslmed.3008226.
16. Eshhar Z., Waks T., Gross G., Schindler D.G. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1993, Vol. 90, no. 2, pp. 720-724.

17. Freimüller C., Stemberger J., Artwohl M., Germeroth L., Witt V., Fischer G., Tischer S., Eiz-Vesper B., Knippertz I., Dörrie J., Schaft N., Lion T., Fritsch G., Geyeregger R. Selection of adenovirus-specific and Epstein-Barr virus-specific T cells with major histocompatibility class I streptamers under Good Manufacturing Practice (GMP)-compliant conditions. *Cytotherapy*, 2015, Vol. 17, no. 7, pp. 989-1007.
18. Gattinoni L., Lugli E., Ji Y., Pos Z., Paulos C.M., Quigley M.F., Almeida J.R., Gostick E., Yu Z., Carpenito C., Wang E., Douek D.C., Price D.A., June C.H., Marincola F.M., Roederer M., Restifo N.P. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat. Med.*, 2011, Vol. 17, no. 10, pp. 1290-1297.
19. Grupp S.A., Kalos M., Barrett D., Aplenc R., Porter D.L., Rheingold S.R., Teachey D.T., Chew A., Hauck B., Wright J.F., Milone M.C., Levine B.L., June C.H. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2013, Vol. 368, no. 16, pp. 1509-1518.
20. Gupta P., Han S.Y., Holgado-Madruga M., Mitra S.S., Li G., Nitta R.T., Wong A.J. Development of an EGFRvIII specific recombinant antibody. *BMC Biotechnol.*, 2010, Vol. 10, 72. doi: 10.1186/1472-6750-10-72.
21. Hamid O., Robert C., Daud A., Hodi F.S., Hwu W.J., Kefford R., Wolchok J.D., Hersey P., Joseph R.W., Weber J.S., Dronca R., Gangadhar T.C., Patnaik A., Zarour H., Joshua A.M., Gergich K., Ellassais-Schaap J., Algazi A., Mateus C., Boasberg P., Tumeo P.C., Chmielowski B., Ebbinghaus S.W., Li X.N., Kang S.P., Ribas A. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 2013, Vol. 369, no. 2, pp. 134-144.
22. Hammill J.A., VanSeggelen H., Helsen C.W., Denisova G.F., Eveleigh C., Tantalos D.G., Bassett J.D., Bramson J.L. Designed ankyrin repeat proteins are effective targeting elements for chimeric antigen receptors. *J. Immunother. Cancer*, 2015, Vol. 3, 55. doi: 10.1186/s40425-015-0099-4.
23. Hao C., Parney I.F., Roa W.H., Turner J., Petruk K.C., Ramsay D.A. Cytokine and cytokine receptor mRNA expression in human glioblastomas: evidence of Th1, Th2 and Th3 cytokine dysregulation. *Acta Neuropathol.*, 2002, Vol. 103, no. 2, pp. 171-178.
24. Heathman T.R., Nienow A.W., McCall M.J., Coopman K., Kara B., Hewitt C.J. The translation of cell-based therapies: clinical landscape and manufacturing challenges. *Regen. Med.*, 2015, Vol. 10, no. 1, pp. 49-64.
25. Hinrichs C.S., Borman Z.A., Gattinoni L., Yu Z., Burns W.R., Huang J., Klebanoff C.A., Johnson L.A., Kerkar S.P., Yang S., Muranski P., Palmer D.C., Scott C.D., Morgan R.A., Robbins P.F., Rosenberg S.A., Restifo N.P. Human effector CD8⁺ T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy. *Blood*, 2011, Vol. 117, no. 3, pp. 808-814.
26. Hollyman D., Stefanski J., Przybylowski M., Bartido S., Borquez-Ojeda O., Taylor C., Yeh R., Capacio V., Olszewska M., Hosey J., Sadelain M., Brentjens R.J., Rivière I. Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy. *J. Immunother.*, 2009, Vol. 32, no. 2, pp. 169-180.
27. Jamnani F.R., Rahbarizadeh F., Shokrgozar M.A., Mahboudi F., Ahmadvand D., Sharifzadeh Z., Parhamifar L., Moghimi S.M. T cells expressing VHH-directed oligoclonal chimeric HER2 antigen receptors: towards tumor-directed oligoclonal T cell therapy. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, Vol. 1840, no. 1, pp. 378-386.
28. Keu K.V., Witney T.H., Yaghoubi S., Rosenberg J., Kurien A., Magnusson R., Williams J., Habte F., Wagner J.R., Forman S., Brown C., Allen-Auerbach M., Czernin J., Tang W., Jensen M.C., Badie B., Gambhir S.S. Reporter gene imaging of targeted T cell immunotherapy in recurrent glioma. *Sci. Transl. Med.*, 2017, Vol. 9, no. 373, eaag2196. doi: 10.1126/scitranslmed.aag2196.
29. Kim J.V., Latouche J.B., Rivière I., Sadelain M. The ABCs of artificial antigen presentation. *Nat. Biotechnol.*, 2004, Vol. 22, no. 4, pp. 403-410.
30. Kochenderfer J.N., Wilson W.H., Janik J.E., Dudley M.E., Stetler-Stevenson M., Feldman S.A., Maric I., Raffeld M., Nathan D.A., Lanier B.J., Morgan R.A., Rosenberg S.A. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood*, 2010, Vol. 116, no. 20, pp. 4099-4102.
31. Krenciute G., Prinzing B.L., Yi Z., Wu M.F., Liu H., Dotti G., Balyasnikova I.V., Gottschalk S. Transgenic expression of IL15 improves antitumor activity of IL13Rα2-CAR T Cells but results in antigen loss variants. *Cancer Immunol. Res.*, 2017, Vol. 5, no. 7, pp. 571-581.
32. Kumaresan P., Figliola M., Moyes J.S., Huls M.H., Tewari P., Shpall E.J., Champlin R., Cooper L.J. Automated cell enrichment of cytomegalovirus-specific T cells for clinical applications using the cytokine-capture system. *J. Vis. Exp.*, 2015, Vol. 104, 52808. doi: 10.3791/52808.
33. Lee D.W., Kochenderfer J.N., Stetler-Stevenson M., Cui Y.K., Delbrook C., Feldman S.A., Fry T.J., Orentas R., Sabatino M., Shah N.N., Steinberg S.M., Stronck D., Tschernia N., Yuan C., Zhang H., Zhang L., Rosenberg S.A., Wayne A.S., Mackall C.L. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*, 2015, Vol. 385, no. 9967, pp. 517-528.
34. Lynch A., Hawk W., Nylen E., Ober S., Autin P., Barber A. Adoptive transfer of murine T cells expressing a chimeric-PD1-Dap10 receptor as an immunotherapy for lymphoma. *Immunology*, 2017, Vol. 152, no. 3, pp. 472-483.
35. MacLeod D.T., Antony J., Martin A.J., Moser R.J., Hekele A., Wetzel K.J., Brown A.E., Triggiano M.A., Hux J.A., Pham C.D., Bartsevich V.V., Turner C.A., Lape J., Kirkland S., Beard C.W., Smith J., Hirsch M.L.,

Nicholson M.G., Jantz D., McCreedy B. Integration of a CD19 CAR into the TCR Alpha chain locus streamlines production of allogeneic gene-edited CAR T Cells. *Mol. Ther.*, 2017 Apr 5, Vol. 25, no. 4, pp. 949-961.

36. Maher J., Brentjens R.J., Gunset G., Rivière I., Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat. Biotechnol.*, 2002, Vol. 20, no. 1, pp. 70-75.

37. Maude S.L., Frey N., Shaw P.A., Aplenc R., Barrett D.M., Bunin N.J., Chew A., Gonzalez V.E., Zheng Z., Lacey S.F., Mahnke Y.D., Melenhorst J.J., Rheingold S.R., Shen A., Teachey D.T., Levine B.L., June C.H., Porter D.L., Grupp S.A. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2014, Vol. 371, no. 16, pp. 1507-1517.

38. Miliotou A.N., Papadopoulou L.C. CAR T-cell therapy: a new era in cancer immunotherapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2018, Vol. 19, no. 1, pp. 5-18.

39. Milone M.C., Fish J.D., Carpenito C., Carroll R.G., Binder G.K., Teachey D., Samanta M., Lakhani M., Gloss B., Danet-Desnoyers G., Campana D., Riley J.L., Grupp S.A., June C.H. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy *in vivo*. Version 2. *Mol. Ther.*, 2009, Vol. 17, no. 8, pp. 1453-1464.

40. Mirzaei R., Sarkar S., Yong V.W. T Cell exhaustion in glioblastoma: intricacies of immune checkpoints. *Trends Immunol.*, 2017, Vol. 38, no. 2, pp. 104-115.

41. Naldini L., Blömer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M., Trono D. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 1996, Vol. 272, no. 5259, pp. 263-267.

42. Newick K., O'Brien S., Moon E., Albelda S.M. CAR T Cell therapy for solid tumors. *Annu. Rev. Med.*, 2017, Vol. 68, pp. 139-152.

43. Park S., Shevlin E., Vedvyas Y., Zaman M., Park S., Hsu Y.S., Min I.M., Jin M.M. Micromolar affinity CAR T cells to ICAM-1 achieves rapid tumor elimination while avoiding systemic toxicity. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 14366. doi: 10.1038/s41598-017-14749-3.

44. Petersen C.T., Krenciute G. Next generation CAR T Cells for the immunotherapy of high-grade glioma. *Front. Oncol.*, 2019, Vol. 9, 69. doi: 10.3389/fonc.2019.00069.

45. Powell D.J. Jr., Brennan A.L., Zheng Z., Huynh H., Cotte J., Levine B.L. Efficient clinical-scale enrichment of lymphocytes for use in adoptive immunotherapy using a modified counterflow centrifugal elutriation program. *Cytotherapy*, 2009, Vol. 11, no. 7, pp. 923-935.

46. Qazi M.A., Vora P., Venugopal C., Sidhu S.S., Moffat J., Swanton C., Singh S.K. Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma. *Ann. Oncol.*, 2017, Vol. 28, no. 7, pp. 1448-1456.

47. Riccione K., Suryadevara C.M., Snyder D., Cui X., Sampson J.H., Sanchez-Perez L. Generation of CAR T cells for adoptive therapy in the context of glioblastoma standard of care. *J. Vis. Exp.*, 2015, Vol. 96, 52397. doi: 10.3791/52397.

48. Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.M., Leitman S., Chang A.E., Ettinghausen S.E., Matory Y.L., Skibber J.M., Shiloni E., Vetto J.T., Seipp C.A., Simpson C., Reichert C.M. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.*, 1985, Vol. 313, no. 23, pp. 1485-1492.

49. Sadelain M., Brentjens R., Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov.*, 2013, Vol. 3, no. 4, pp. 388-398.

50. Sampson J.H., Choi B.D., Sanchez-Perez L., Suryadevara C.M., Snyder D.J., Flores C.T., Schmittling R.J., Nair S.K., Reap E.A., Norberg P.K., Herndon J.E. 2nd, Kuan C.T., Morgan R.A., Rosenberg S.A., Johnson L.A. EGFRvIII mCAR-modified T-cell therapy cures mice with established intracerebral glioma and generates host immunity against tumor-antigen loss. *Clin. Cancer Res.*, 2014, Vol. 20, no. 4, pp. 972-984.

51. Singh H., Huls H., Kebriaei P., Cooper L.J. A new approach to gene therapy using Sleeping Beauty to genetically modify clinical-grade T cells to target CD19. *Immunol. Rev.*, 2014, Vol. 257, no. 1, pp. 181-190.

52. Srivastava S., Riddell S.R. Engineering CAR-T cells: Design concepts. *Trends Immunol.*, 2015, Vol. 36, no. 8, pp. 494-502.

53. Suhoski M.M., Golovina T.N., Aquino N.A., Tai V.C., Varela-Rohena A., Milone M.C., Carroll R.G., Riley J.L., June C.H. Engineering artificial antigen-presenting cells to express a diverse array of co-stimulatory molecules. *Mol. Ther.*, 2007, Vol. 15, no. 5, pp. 981-988.

54. Thayaparan T., Petrovic R.M., Achkova D.Y., Zabinski T., Davies D.M., Klampatsa A., Parente-Pereira A.C., Whilding L.M., van der Stegen S.J., Woodman N., Sheaff M., Cochran J.R., Spicer J.F., Maher J. CAR T-cell immunotherapy of MET-expressing malignant mesothelioma. *Oncoimmunology*, 2017, Vol. 6, no. 12, e1363137. doi: 10.1080/2162402X.2017.1363137.

55. van der Stegen S.J., Hamieh M., Sadelain M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2015, Vol. 14, no. 7, pp. 499-509.

56. Wang X., Rivière I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol. Ther. Oncolytics*, 2016, Vol. 3, 16015. doi: 10.1038/mto.2016.15.

57. Zhang H., Ye Z.L., Yuan Z.G., Luo Z.Q., Jin H.J., Qian Q.J. New strategies for the treatment of solid tumors with CAR-T Cells. *Int. J. Biol. Sci.*, 2016, Vol. 12, no. 6, pp. 718-729.

58. Zhong X.S., Matsushita M., Plotkin J., Riviere I., Sadelain M. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8⁺ T cell-mediated tumor eradication. *Mol. Ther.*, 2010, Vol. 2, pp. 413-420.

59. Zhu C., Mustafa D., Zheng P.P., van der Weiden M., Sacchetti A., Brandt M., Chrifi I., Tempel D., Leenen P.J.M., Duncker D.J., Cheng C., Kros J.M. Activation of CECR1 in M2-like TAMs promotes paracrine stimulation-mediated glial tumor progression. *Neuro Oncol.*, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 648-659.

Авторы:

Тимофеева С.В. — научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Ситковская А.О. — заведующая лабораторией клеточных технологий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Новикова И.А. — к.м.н., заместитель генерального директора по науке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Ежова М.О. — врач-онколог ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Лысенко Е.П. — к.м.н., врач-онколог ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Кит О.И. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Timofeeva S.V., Research Associate, Cell Technology Laboratory, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Sitkovskaya A.O., Head, Cell Technology Laboratory, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Novikova I.A., PhD (Medicine), Deputy General Director for Research, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Ezhova M.O., Clinical Oncologist, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Lysenko E.P., PhD (Medicine), Clinical Oncologist, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Kit O.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, General Director, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 29.07.2020
Принята к печати 28.11.2020

Received 29.07.2020
Accepted 28.11.2020