

УДК 571.27

# Молекулярные подходы к безопасной и контролируемой Т-клеточной терапии

Р. С. Калинин<sup>1</sup>, А. В. Петухов<sup>1</sup>, В. Д. Кнорре<sup>1</sup>, М. А. Масчан<sup>2</sup>, А. В. Степанов<sup>1\*</sup>, А. Г. Габитов<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1

\*E-mail: stepanov.aleksei.v@gmail.com

Поступила в редакцию 07.12.2017

Принята к печати 14.05.2018

**РЕФЕРАТ** Введение Т-клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами (САРТ), является одним из наиболее активно развивающихся направлений иммуноонкологии. За последнее десятилетие данная область клеточной терапии совершила значительный скачок от оптимизации структуры химерных антигенных рецепторов и экспериментов на модельных животных до успешного клинического применения. Изначально вектор развития САРТ был направлен на увеличение активации, цитотоксичности и персистенции модифицированных Т-клеток. Однако первые же попытки клеточной терапии выявили необходимость создания безопасных и контролируемых САРТ Т-клеток. В представленном обзоре детально рассмотрены современные принципиально различные подходы к созданию и применению безопасных химерных антигенных рецепторов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** клеточная терапия, опухолевые клетки, Т-клетки, химерные антигенные рецепторы.

## ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день одним из наиболее перспективных направлений в терапии онкологических заболеваний является адоптивная клеточная иммунотерапия, впервые примененная при метастатической саркоме в 1985 году [1, 2]. При проведении такой терапии выделяют, активируют и размножают аутологичные Т-лимфоциты, а затем их вводят обратно пациенту, что приводит к частичной регрессии или эрадикации опухоли [3–6]. Применение аутологичных Т-лимфоцитов позволяет избежать реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и, что немаловажно, увеличивает персистенцию терапевтически активных клеток [7–9], однако, в большинстве случаев эффективность адоптивной иммунотерапии оказывается недостаточной [10]. Следующим витком в развитии данного направления было получение Т-лимфоцитов, способных направленно узнавать опухолевые клетки и преодолевать иммуносупрессорные механизмы раковых клеток. Одна из модификаций лимфоцитов – введение искусственного Т-клеточного рецептора (TCR), специфичного к опухолевым антигенам (ТАА – tumour-associated antigens) [11]. К сожалению, Т-клетки, модифицированные TCR, способны распознавать только

процессированные протеасомой антигены, презентованные в контексте главного комплекса гистосовместимости класса I (МНС I). Перечисленных недостатков лишен наиболее современный подход – модификация Т-клеток генами химерных антигенных рецепторов (chimeric antigen receptor, CAR), которая помогает лимфоцитам распознавать нативные антигены на мембране раковых клеток независимо от МНС I. Структурно CAR состоит из трех функциональных частей: внеклеточного домена, распознающего антиген, трансмембранного домена и внутриклеточной части, включающей домен активации Т-клеток CD3 $\zeta$  и в зависимости от поколения рецептора различные костимулирующие домены (рисунков А) [12]. Впервые метод использования МНС I независимых рекомбинантных антигенных рецепторов был описан Eshhar Z. и его коллегами в Институте науки имени Вейцмана в конце 1980-х [13]. С использованием этого подхода, эволюционировавшего в CART-терапию, получены обнадеживающие результаты при гематологических опухолевых заболеваниях. Так, клинические испытания CART, направленных против В-лимфоцитарного антигена CD19, показали их эффективность при лечении резистентных к химиотерапии опухолей В-клеточного проис-

хождения [14–18]. Наконец, в 2017 году Управление по надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) одобрило применение CART (препараты Kymriah от компании Novartis и Yescarta от компании Kite Pharma), направленных против CD19, при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ).

### ОПАСНОСТИ CART-ТЕРАПИИ

Отличительной особенностью CART, обнаруженной уже при первых клинических испытаниях, оказалась их исключительная эффективность. Введение модифицированных Т-клеток привело к экспоненциальному росту их численности и активной элиминации опухолевых клеток в течение нескольких недель [19]. Обратной стороной такой эффективной терапии является высокий риск возникновения системных и опасных для жизни побочных эффектов, в первую очередь, гиперцитокинемии (цитокиновый шторм, цитокиновый каскад, синдром выброса цитокинов (CRS)) и синдрома лизиса опухоли [20–23]. Эти осложнения могут спровоцировать развитие синдрома полиорганной недостаточности и, как следствие, привести к летальному исходу. Купировать осложнения, вызванные Т-клетками, можно кортикостероидами цитостатического и цитотоксического действия [24], что, однако, приводит к подавлению всех Т-клеток и вызывает ряд побочных эффектов, в частности, системные повреждения органов [25]. Еще одна существенная проблема применения CART – неспецифическая цитотоксичность, которая особенно актуальна в случае терапии солидных опухолей, к которым крайне сложно подобрать специфичные ТАА [26–29]. Так, проведение клинических испытаний CART, специфичных к карбоангидразе IX, которая сверхэкспрессируется в клетках рака почки, но присутствует также и в нормальных тканях, включая печень, выявило неспецифическую цитотоксичность CART, приведшую к появлению осложнений у пациентов [26, 28]. Кроме того, использование CAR, специфичного к HER2, при метастатическом раке толстой кишки привело к возникновению сразу после инфузии CART интенсивной и быстрой кросс-реакции на здоровые клетки легких, экспрессирующих HER2 в малых количествах, и гибели пациента [30]. Для повышения безопасности терапии и устранения существующих недостатков, таких, как отложенная перекрестная реактивность и токсичность уже после успешно проведенной CART-терапии, необходима дальнейшая разработка методов контроля экспансии и цитотоксичности лимфоцитов уже введенных пациенту [6, 31]. В настоящем обзоре суммированы различные молекулярные подходы к безопасной и контролируемой Т-клеточной терапии.

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНА ТИМИДИНКИНАЗЫ ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА (HSV-TK)

Тимидинкиназа вируса простого герпеса на протяжении многих лет активно применяется как в лабораторных, так и в клинических исследованиях для индукции гибели клеток. Тимидинкиназа HSV-TK фосфорилирует ганцикловир до монофосфатной формы, который клеточные киназы последовательно превращает в ди- и трифосфатные (рисунок Б) [32–34]. Трифосфатная форма ганцикловира включается в ДНК при элонгации и репликации, нарушая работу ДНК-полимеразы, что приводит к гибели клетки [35, 36]. Фосфорилированный вирусной тимидинкиназой ганцикловир независимо от CD95-L приводит к агрегации CD95, которая индуцирует формирование Fas-ассоциированного белка с доменом смерти (FADD) и активации каспазы-8 [37]. Элиминация модифицированных клеток с использованием ганцикловира и клеток, несущих ген вирусной тимидинкиназы, является наиболее изученной методикой с доказанной безопасностью и эффективностью [34, 38]. Однако у этого подхода есть недостатки, заключающиеся в иммуногенности вирусной HSV-TK [39]. В ходе клинических испытаний была выявлена недостаточно быстрая элиминация Т-лимфоцитов, что обусловлено необходимостью в репликации ДНК для встраивания токсичного нуклеотидного аналога в геном [38, 40]. Кроме того, проведению подобной терапии может препятствовать наличие герпесвирусной инфекции. Несмотря на очевидные ограничения этого подхода, использование в клиническом испытании аллогенных лимфоцитов, модифицированных HSV-TK, показало отсутствие острой токсичности и иммуногенного ответа на HSV-TK [41]. У двух пациентов ганцикловир применяли для терапии РТПХ, и в обоих случаях была достигнута полная элиминация клеток HSV-TK<sup>+</sup>, однако РТПХ удалось устранить лишь у одного из них. Развития иммунного ответа на HSV-TK не наблюдали и в клиническом испытании NCT01204502 [42], но РТПХ при этом также отсутствовала (возможно, в связи с иммунодепрессивным состоянием пациентов и низкой дозой вводимых Т-лимфоцитов).

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИМИЧЕСКИ ИНДУЦИРУЕМОЙ КАСПАЗЫ-9

Интересным и перспективным подходом к контролируемому запуску апоптоза у CART является применение химерных молекул на основе проапоптотических сигнальных белков, способных к димеризации и активации в присутствии низкомолекулярных соединений [43, 44]. Один из ярчайших примеров – химерная каспаза-9 (iCasp9) [45], состоящая из двух ключевых компонентов: усеченного варианта ка-

спазы-9 и фрагмента FКРВ12-связывающего белка с мутацией F36V (FK506). Этот химерный белок димеризуется в присутствии римидуцида (AP1903), что приводит к запуску апоптотического каскада (рисунки А, Б). Система iCasp9 имеет ряд безусловных преимуществ перед HSV-TK. Во-первых, она состоит из продуктов генов человека с низкой потенциальной иммуногенностью. Во-вторых, введение лекарственного средства не вызывает выраженных побочных эффектов и приводит к селективной элиминации исключительно CART [46]. Также iCasp9 сохраняет функциональную активность даже в Т-клетках с повышенной экспрессией антиапоптотических белков [43, 47–49]. Основное преимущество iCasp9 перед системой HSV-TK – ее быстрое действие. Введение AP1903 приводит к элиминации CART в течение нескольких часов. Эффективность iCasp9 подтверждена для CART различной специфичности (CD19, CD20, CD30). Эффективность и безопасность подхода доказаны также в ходе клинических испытаний (NCT02274584), в которых принимали участие больные лимфомой [50].

### **ЭЛИМИНАЦИЯ CART С ПОМОЩЬЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ**

За последнее десятилетие применение моноклональных антител (монАт) в терапии онкологических заболеваний стало распространенной практикой. Именно на основе вариабельных доменов терапевтических антител создают новые химерные антигенные рецепторы. Интересно, что некоторые антитела, уже прошедшие все необходимые клинические испытания и одобренные FDA, могут быть использованы для элиминации CART при возникновении осложнений, вызванных клеточной терапией [51–53]. Чтобы элиминировать Т-клетки с помощью монАт, поверхность CART должна содержать соответствующий антиген (рисунки В, Г). Этот же антиген может быть использован для селекции клеток CART<sup>+</sup> после модификации лимфоцитов [9]. Одними из первых работ в этом направлении стали эксперименты по трансдукции Т-клеток молекулой CD20 с дальнейшей инфузией анти-CD20-моноклональных антител, которые хорошо зарекомендовали себя в терапии лимфопролиферативных заболеваний В-клеточной природы [54–56]. Аналогичная система разработана для укороченной формы рецептора эпидермального фактора роста (tEGFR), которая служит мишенью для коммерчески доступного препарата цетуксимаб [52]. Было проведено несколько клинических испытаний tEGFR, однако применение цетуксимаба в них для элиминации CART не сочли достаточно обоснованным. Проведены также работы, в которых эпитоп монАт был внесен в последовательность внеклеточ-

ного домена CAR. Подобный подход был применен в доклиническом исследовании, в котором использовали рекомбинантный TCR с добавленной 10-аминокислотной последовательностью эпитопа с-тус [9, 51]. Однако в случае клинического использования монАт для элиминации CART следует учитывать собственную цитотоксичность антитела и возможные осложнения [9].

### **РАСПОЗНАВАНИЕ «СВОЙ-ЧУЖОЙ»**

Проблема подбора ТАА, специфичного только для опухолевых клеток, стоит давно, поскольку крайне сложно подобрать уникальные антигены для большого количества раковых клеток. Однако можно подобрать детерминированные паттерны антигенов, характерных для здоровых и опухолевых клеток. В своей работе Федоров с соавт. [57] предложили использовать дополнительный химерный рецептор, который защищает нормальные клетки от неспецифической цитотоксичности CART за счет передачи ингибирующего сигнала при взаимодействии химерного рецептора с антигенами здоровых клеток (iCAR) (рисунки Д, Е). Клетки, модифицированные iCAR, ингибируют стимулирующие сигналы основного CAR через внутриклеточные домены PD-1 или CTLA-4. Главное преимущество подхода заключается в том, что это ингибирование обратимо и позволяет Т-клеткам функционировать при последующей встрече с опухолевой клеткой [57]. Существенными ограничениями для клинического применения iCAR являются корректный подбор уровня экспрессии химерного рецептора, баланс аффинности распознающих доменов, вариативность набора антигенов на раковых и здоровых клетках, а также индивидуальные особенности каждого пациента [57].

### **ЭЛИМИНАЦИЯ КЛЕТКИ, НЕСУЩЕЙ ОПРЕДЕЛЕННУЮ КОМБИНАЦИЮ АНТИГЕНОВ**

Особенно остро проблема поиска опухолеспецифичных антигенов выражена у солидных опухолей [58]. Поэтому для повышения избирательности и безопасности CART предложено экспрессировать два рецептора, специфичных к разным опухолевым антигенам. И только если все CAR (у одного рецептора может быть стимулирующий домен CD3 $\zeta$ , а у другого CD28) распознали свою мишень, Т-клетка получает уровень стимуляции, достаточный для активации (рисунки Ж, З) [59–63]. Применение системы «двойного наведения» позволяет существенно снизить выраженность побочных эффектов даже в отсутствие специфичного опухолевого антигена [62]. При сравнении CART, несущих два рецептора, и контрольных CART, имеющих единый рецептор со всеми внутри-

клеточными доменами, показано, что при одинаковой эффективности *in vivo* уровень секреции интерлейкина-2 в них существенно ниже [63]. Однако при использовании двойных CAR необходимо учитывать, что эффективность элиминации и пролиферации клеток будет прямо зависеть от баланса сигналов двух рецепторов, оптимум которого находится в довольно узком диапазоне. Сильное различие в количестве двух целевых антигенов на опухолевой клетке или полное отсутствие одного может нивелировать эффективность клеточной терапии.

Другой стратегией стало создание синтетического рецептора Notch (synNotch), который связывается со вторым антигеном на опухолевой клетке, после чего запускает через транскрипционные факторы экспрессию CAR внутри Т-клетки (рисунки Д) [64]. CAR в свою очередь связывается со своим антигеном на опухолевой клетке и активирует цитотоксичность этой CART. Благодаря такому механизму достигается локализованное подавление опухолевых клеток без риска неспецифической цитотоксичности по отношению к здоровым тканям.

Таким образом, включение в распознавание двух различных антигенов на опухолевых клетках увеличивает выбор целевых антигенов для CART, одновременно уменьшая токсичность, получаемую от использования традиционных CART-клеток. Тем не менее таким способом, а также модификацией iCARs нельзя контролировать CART лимфоциты в режиме реального времени и интенсивность их активности [65]. Еще одним из возможных решений задачи поиска антигена, специфичного для здоровых клеток, могут быть постоянно расширяющиеся базы данных белков человека [66]. Перспективным антигеном, отличающим здоровые клетки от опухолевых, может быть также МНС, который присутствует почти на всех здоровых клетках, тогда как на раковых клетках экспрессия МНС снижается для ухода от иммунного ответа [67].

### КОНТРОЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ХИМЕРНОГО АНТИГЕННОГО РЕЦЕПТОРА

Так как активация и цитотоксичность модифицированных Т-клеток непосредственно зависят от количества рецептора на мембране клетки, то, регулируя экспрессию гена химерного антигенного рецептора, можно контролировать эффективность клеточной терапии. Индуцибельные промоторы активно применяются для регуляции экспрессии генов на протяжении нескольких десятилетий. Удобным инструментом регуляции экспрессии генов в эукариотических клетках служит система тетрациклин-активируемого промотора. С помощью дозированного введения регуляторной молекулы можно контролировать экспрес-

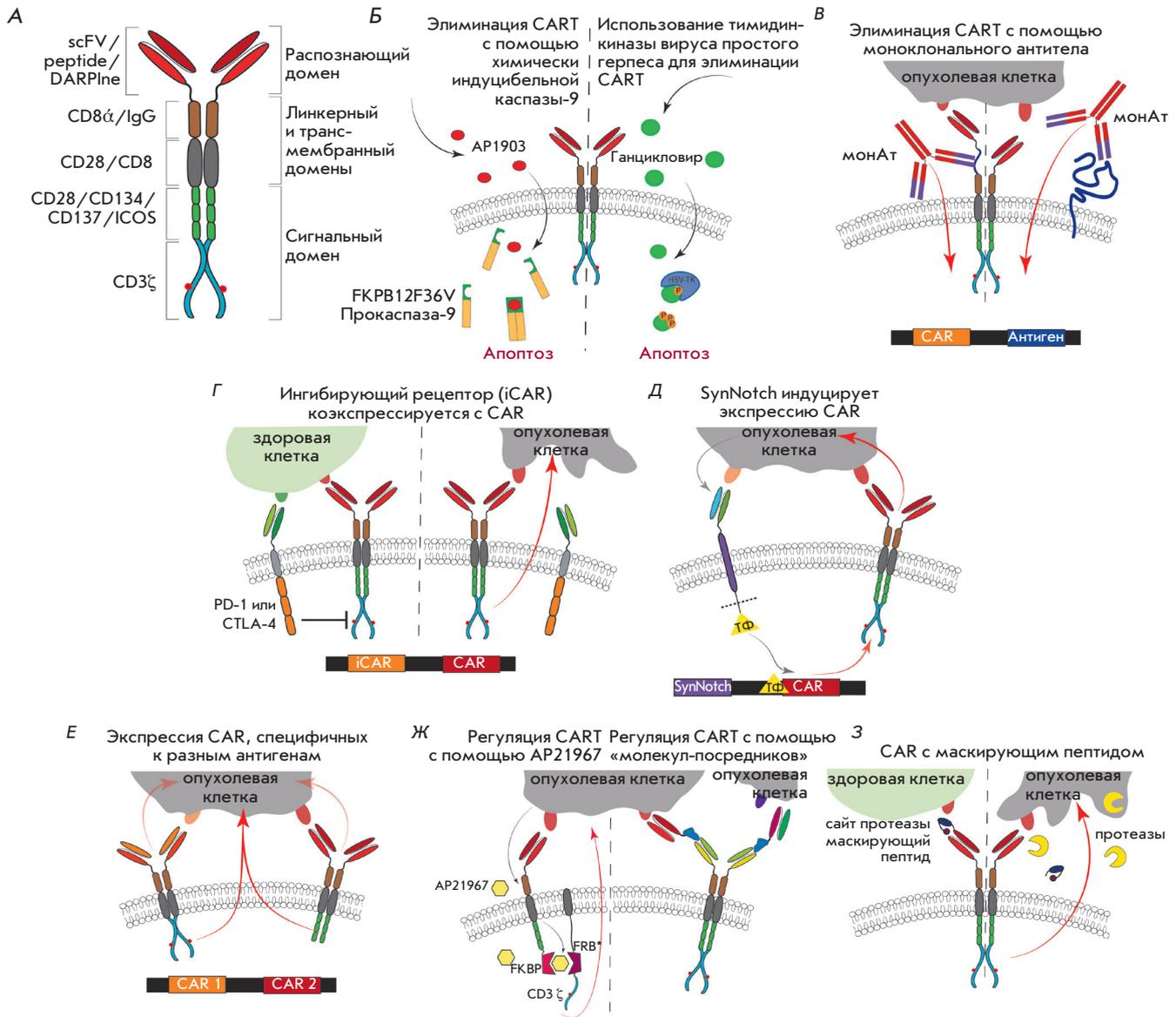
сию CAR в модифицированных Т-клетках. В первом случае доксициклин блокирует экспрессию CAR [68]. Во-втором, наоборот, – CAR экспрессируется только в присутствии доксициклина [69]. Удобство такого метода не только в регуляции цитотоксичности, но и в культивировании CART *ex vivo*, где на функциональное состояние и фенотип не влияет присутствие CAR, в отличие от постоянной экспрессии CAR. Однако эксперименты *in vivo* показали иммуногенность компонентов системы тетрациклин-активируемого промотора [68].

### КОНТРОЛЬ АКТИВАЦИИ ХИМЕРНОГО АНТИГЕННОГО РЕЦЕПТОРА

Как уже упоминалось, химерные антигенные рецепторы состоят из трех ключевых доменов: распознающего, трансмембранного и сигнального. Прямая связь между связыванием антигена и активацией рецептора обеспечивает высокую эффективность CART. Для контроля интенсивности передачи сигнала от распознающего домена к сигнальному структуру рецептора значительно изменили, разбив его на две части: антигенсвязывающую внеклеточную и внутриклеточную с сигнальными доменами. Обе части рецептора содержат домены гетеродимеризации (FKBP и FRB\*), которые гибридизуются в присутствии AP21967, аналога рапамицина, обладающего меньшей иммуносупрессивной активностью по сравнению с рапамицином [70, 71]. Таким образом, иммунореактивность терапевтических CART-клеток зависит от опухолевого антигена и низкомолекулярного агента, концентрацию которого можно дозировать (рисунки Ж). Анализ терапевтического потенциала показал, что AP21967-зависимые CART и обычные CART не отличаются по своей эффективности *in vitro* и *in vivo* [65]. Между тем, использование такой технологии требует разработки новых классов лекарственных средств – контроллеров, оптимизированных для клинического применения в сочетании с терапевтическими модифицированными клетками [65, 72–74].

### «МОЛЕКУЛЫ-ПОСРЕДНИКИ», ГИБРИДИЗУЮЩИЕСЯ С ВНЕКЛЕТОЧНЫМИ ДОМЕНОМ CAR И ОПУХОЛЕВЫМ АНТИГЕНОМ

Модулировать можно не только интенсивность передачи сигнала от распознающего домена к сигнальному, но и уровень распознавания антигена. Наиболее перспективным представляется применение так называемых «молекул-посредников» (рисунки Ж) – белков или низкомолекулярных соединений, которые одним концом взаимодействуют с опухолевым антигеном, а другим с CAR-модифицированными Т-клетками, так называемыми переключаемыми



Способы регуляции CART. А – общая структура CAR. Б – элиминация CART посредством экзогенных молекул. На правой стороне рисунка HSV-TK фосфорилирует ганцикловир до монофосфатной формы, которую клеточные киназы последовательно превращают в ди- и трифосфатную. Трифосфатная форма ганцикловира включается в ДНК при элонгации и репликации, что приводит к гибели клетки. На левой стороне рисунка – укороченный вариант каспазы-9 и фрагмент FK506 димеризуются в присутствии препарата римиудцида (AP1903), что приводит к запуску апоптотического каскада. В – на поверхность CART или в линкерную область CAR добавляют антиген к моноклональному антителу, с помощью которого можно элиминировать CART. Г – iCAR взаимодействует с антигеном на здоровой клетке и через внутриклеточные домены PD-1 или CTLA-4 ингибирует работу CAR. Это ингибирование обратимо, что позволяет Т-клеткам функционировать при последующей встрече с опухолевой клеткой. Д – после взаимодействия дополнительного рецептора (synNotch) с одним опухолевым антигеном, с помощью транскрипционных факторов (ТФ), происходит запуск экспрессии CAR, который распознает второй опухолевый антиген и индуцирует цитотоксичность. Е – достаточная активация CART происходит только при взаимодействии двух CAR с двумя разными опухолевыми антигенами. Ж – модульные CAR. На левой стороне рисунка – активационная способность CAR восстанавливается только при димеризации белка, связывающего FK 506 (FKBP), с мутантом T2089L FKBP-рапамидин (FRB\*) через вводимый экзогенно аналог рапамидина (AP21967). На правой стороне рисунка – активация CAR происходит только через экзогенную «молекулу-посредник». З – модификация внеклеточной области CAR маскирующим пептидом, который отщепляется в микроокружении опухоли, что позволяет CAR взаимодействовать со своим антигеном

(универсальными) CART [75, 76]. Модульность такого подхода позволяет увеличить диапазон антигенов при использовании одних и тех же CART, а за счет дозирования «молекул-посредников» можно регулировать интенсивность Т-клеточного ответа и не допускать гиперцитокинемии или синдрома лизиса опухоли [77]. Подобная стратегия может оказаться крайне перспективной при поликлональных и рецидивирующих опухолях, когда необходимо переключить направленность Т-клеточного ответа [78, 79]. В качестве «молекул-посредников» могут быть использованы антитела, слитые с неиммуногенным антигеном, к которому специфичны CART, либо CAR, специфичные к Fc-фрагменту терапевтического моноклонального антитела [75–77, 80–84]. Данный подход был реализован с помощью рекомбинантных анти-CD19-антител, содержащих неиммуногенный эпитоп дрожжевого фактора транскрипции GCN4, к которому, в свою очередь, был специфичен антигенраспознающий домен CART [77]. Эти же CART удалось перенаправить с помощью антител, специфичных к CD20, модифицированных эпитопом GCN4 [77]. Интересной оказалась прямая зависимость фенотипа CART от концентрации «молекул-посредников» – при низких дозах количество центральных клеток памяти значительно увеличивается. Помимо антител для распознавания ТАА можно использовать модифицированные природные полипептиды или их фрагменты с гипервариабельными пептидными сегментами, отвечающими за молекулярное узнавание [85]. Также можно использовать уже хорошо известные аффинные пары, например биотин и авидин [76]. По такому же принципу созданы антитела, специфичные к CD19, конъюгированные с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (FITC), или фолиевую кислоту, слитую с FITC. Такие «молекулы-посредники» распознаются универсальными анти-FITC-CAR Т-клетками [83, 86]. В качестве универсальных CART также разрабатываются CD16-CAR, специфичные к Fc-домену антител, что позволит применять моноклональные антитела в такой терапии [80–82].

Таким образом, переключаемые CART представляют собой перспективную новую парадигму клеточной терапии, которая потенциально повысит безопасность и универсальность CART. Этот подход позволит упростить производство CART-клеток и снизить стоимость лечения. Имея возможность переключения направления терапии за счет смены «молекул-посредников», врачи смогут незамедлительно вносить коррективы в план лечения. Особенно актуален такой метод для предотвращения рецидивов после возникновения мутаций, которые приводят к исчезновению целевого опухолевого антигена,

а также для эффективной терапии опухолей с гетерогенной экспрессией антигенов [77, 79, 83]. Тем не менее возможность использования «молекул-посредников» в терапии солидных опухолей остается под вопросом, так как их способность к проникновению в ткань опухоли ограничена, что снижает эффективность локальной активации и функционирования CART, в то время как классические CART способны мигрировать в ткань опухоли [87, 88].

#### **МАСКИРОВАНИЕ АНТИГЕНРАСПОЗНАЮЩЕГО ДОМЕНА ХИМЕРНОГО АНТИГЕННОГО РЕЦЕПТОРА**

Снизить токсичность при терапии солидных опухолей можно за счет модификации антигенсвязывающего домена CAR маскирующим пептидом [89], расположенным на N-конце химерного антигенного рецептора перед антигенсвязывающим доменом и экранирующим распознающую функцию CAR (рис. 3). Отличительной особенностью микроокружения некоторых типов опухолей являются специфические протеазы, которые гидролизуют линкер, соединяющий маскирующий пептид и распознающий домен CAR. После расщепления CART могут распознать антиген, представленный на поверхности опухолевых клеток [89]. Данный подход позволяет применять для терапии генно-модифицированными клетками антигены, представленные на здоровых клетках.

#### **ПРИМЕНЕНИЕ мРНК ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ Т-КЛЕТОК**

После введения пациенту, CART активно пролиферируют и дифференцируют в Т-клетки различной специализации. Новые Т-клетки также несут ген CAR, который стимулирует их активацию. Для большинства типов онкологических заболеваний нет необходимости в постоянном присутствии терапевтических Т-клеток в течение всей жизни пациента. Более того, это может вызвать дополнительные осложнения и расходы на восстановление иммунного статуса больного после терапии. Одним из способов временной модификации лимфоцитов CAR является трансфекция Т-клеток мРНК, кодирующей CAR [90]. Такой подход успешно использовали *in vitro* и *in vivo* при изучении CAR, специфичных к CD19 и мезотелину [90, 91]. Впоследствии CART, специфичные к мезотелину, успешно применяли при раке поджелудочной железы [92, 93]. Электропорацию клеток мРНК проводят *in vitro*, что позволяет избежать потенциально опасной интеграции вирусного вектора в геном человека [90, 91]. К сожалению, однократной инфузии мРНК CART бывает недостаточно, что увеличивает стоимость и сложность лечения. Однако многократное введение CART позволяет регулировать количество персистирующих клеток и ин-

тенсивность терапии [90], избегая чрезмерного высвобождения цитокинов, синдрома лизиса опухоли и цитотоксичности в отношении здоровых клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успехи применения CART *in vivo*, а также выданное FDA разрешение на применение при остром лимфобластном лейкозе, поставили клеточную терапию модифицированными лимфоцитами на место самой обсуждаемой и перспективной панацеи от всех видов рака и даже аутоиммунных заболеваний. Однако при ближайшем рассмотрении и массовом проведении клинических испытаний оказалось, что химерные антигенные рецепторы не лишены недостатков и несут опасность для пациента. На первое место ста-

ла выдвигаться не столько эффективность, сколько безопасность и контроль над терапией. Множество биотехнологических приемов и ухищрений были применены для создания CAR новых поколений – более безопасных и контролируемых. Каждый из описанных подходов обладает как рядом преимуществ, так и недостатков. Однако новые подходы позволили существенно приблизить клеточную терапию к применению на более ранних этапах развития опухолевого заболевания, что значительно повышает вероятность благоприятного исхода для пациента и снижает риск потенциальных осложнений. ●

*Работа выполнена при поддержке РФФ  
(грант № 17-74-30019).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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. // *N. Engl. J. Med.* 1985. V. 313. № 23. P. 1485–1492.
- Rosenberg S.A., Mulé J.J. // *Surgery.* 1985. V. 98. № 3. P. 437–444.
- Galluzzi L., Vacchelli E., Eggermont A., Fridman W.H., Galon J., Sautès-Fridman C., Tartour E., Zitvogel L., Kroemer G. // *Oncoimmunology.* 2012. V. 1. № 3. P. 306–315.
- Restifo N.P., Dudley M.E., Rosenberg S.A. // *Nat. Rev. Immunol.* 2012. V. 12. № 4. P. 269–281.
- Rosenberg S.A., Restifo N.P. // *Science.* 2015. V. 348. № 6230. P. 62–68.
- Kalos M., June C.H. // *Immunity.* 2013. V. 39. № 1. P. 49–60.
- de Bueger M., Bakker A., van Rood J.J., van der Woude F., Goulmy E. // *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 1992. V. 149. № 5. P. 1788–1794.
- Ringdén O., Labopin M., Gorin N.C., Schmitz N., Schaefer U.W., Prentice H.G., Bergmann L., Jouet J.P., Mandelli F., Blaise D., et al. // *Br. J. Haematol.* 2000. V. 111. № 4. P. 1130–1137.
- Minagawa K., Zhou X., Mineishi S., Di Stasi A. // *Pharm. Basel Switz.* 2015. V. 8. № 2. P. 230–249.
- Kershaw M.H., Westwood J.A., Darcy P.K. // *Nat. Rev. Cancer.* 2013. V. 13. № 8. P. 525–541.
- Schumacher T.N.M. // *Nat. Rev. Immunol.* 2002. V. 2. № 7. P. 512–519.
- Ramos C.A., Dotti G. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2011. V. 11. № 7. P. 855–873.
- Gross G., Waks T., Eshhar Z. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. № 24. P. 10024–10028.
- Porter D.L., Levine B.L., Kalos M., Bagg A., June C.H. // *N. Engl. J. Med.* 2011. V. 365. № 8. P. 725–733.
- Porter D.L., Kalos M., Zheng Z., Levine B., June C. // *J. Cancer.* 2011. V. 2. P. 331–332.
- Kochenderfer J.N., Dudley M.E., Feldman S.A., Wilson W.H., Spaner D.E., Maric I., Stetler-Stevenson M., Phan G.Q., Hughes M.S., Sherry R.M., et al. // *Blood.* 2012. V. 119. № 12. P. 2709–2720.
- Brentjens R.J., Davila M.L., Riviere I., Park J., Wang X., Cowell L.G., Bartido S., Stefanski J., Taylor C., Olszewska M., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2013. V. 5. № 177. P. 177ra38.
- 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., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2013. V. 368. № 16. P. 1509–1518.
- Kalos M., Levine B.L., Porter D.L., Katz S., Grupp S.A., Bagg A., June C.H. // *Sci. Transl. Med.* 2011. V. 3. № 95. P. 95ra73.
- Brentjens R.J., Riviere I., Park J.H., Davila M.L., Wang X., Stefanski J., Taylor C., Yeh R., Bartido S., Borquez-Ojeda O., et al. // *Blood.* 2011. V. 118. № 18. P. 4817–4828.
- Xu X.-J., Zhao H.-Z., Tang Y.-M. // *Leuk. Lymphoma.* 2013. V. 54. № 2. P. 255–260.
- Xu Y., Zhang M., Ramos C.A., Durett A., Liu E., Dakhova O., Liu H., Creighton C.J., Gee A.P., Heslop H.E., et al. // *Blood.* 2014. V. 123. № 24. P. 3750–3759.
- Davila M.L., Riviere I., Wang X., Bartido S., Park J., Curran K., Chung S.S., Stefanski J., Borquez-Ojeda O., Olszewska M., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2014. V. 6. № 224. P. 224ra25.
- Akpek G., Lee S.M., Anders V., Vogelsang G.B. // *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 2001. V. 7. № 9. P. 495–502.
- Ferrara F., Mele G., Palmieri S., Pedata M., Copia C., Riccardi C., Izzo T., Criscuolo C., Musto P. // *Hematol. Oncol.* 2009. V. 27. № 4. P. 198–202.
- Lamers C.H.J., Langeveld S.C.L., Groot-van Ruijven C.M., Debets R., Sleijfer S., Gratama J.W. // *Cancer Immunol. Immunother. CII.* 2007. V. 56. № 12. P. 1875–1883.
- Johnson L.A., Morgan R.A., Dudley M.E., Cassard L., Yang J.C., Hughes M.S., Kammula U.S., Royal R.E., Sherry R.M., Wunderlich J.R., et al. // *Blood.* 2009. V. 114. № 3. P. 535–546.
- Lamers C.H., Sleijfer S., van Steenberghe S., van Elzakker P., van Krimpen B., Groot C., Vulto A., den Bakker M., Oosterwijk E., Debets R., et al. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2013. V. 21. № 4. P. 904–912.
- Sadelain M., Brentjens R., Riviere I. // *Cancer Discov.* 2013. V. 3. № 4. P. 388–398.
- Morgan R.A., Yang J.C., Kitano M., Dudley M.E., Laurencot C.M., Rosenberg S.A. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2010. V. 18. № 4. P. 843–851.
- Uttenthal B.J., Chua I., Morris E.C., Stauss H.J. // *J. Gene Med.* 2012. V. 14. № 6. P. 386–399.
- Moolten F.L. // *Cancer Res.* 1986. V. 46. № 10. P. 5276–5281.
- Tiberghien P., Reynolds C.W., Keller J., Spence S., Deschaseaux M., Certoux J.M., Contassot E., Murphy W.J., Lyons R., Chiang Y. // *Blood.* 1994. V. 84. № 4. P. 1333–1341.
- Bonini C., Ferrari G., Verzeletti S., Servida P., Zappone E., Ruggieri L., Ponzoni M., Rossini S., Mavilio F., Traversari C., et al. // *Science.* 1997. V. 276. № 5319. P. 1719–1724.

35. Oliveira G., Greco R., Lupo-Stanghellini M.T., Vago L., Bonini C. // *Curr. Opin. Hematol.* 2012. V. 19. № 6. P. 427–433.
36. Greco R., Oliveira G., Stanghellini M.T.L., Vago L., Bondanza A., Peccatori J., Cieri N., Markt S., Mastaglio S., Bordignon C., et al. // *Front. Pharmacol.* 2015. V. 6. P. 95.
37. Beltinger C., Fulda S., Kammertoens T., Meyer E., Uckert W., Debatin K.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 15. P. 8699–8704.
38. Traversari C., Markt S., Magnani Z., Mangia P., Russo V., Ciceri F., Bonini C., Bordignon C. // *Blood.* 2007. V. 109. № 11. P. 4708–4715.
39. Riddell S.R., Elliott M., Lewinsohn D.A., Gilbert M.J., Wilson L., Manley S.A., Lupton S.D., Overell R.W., Reynolds T.C., Corey L., et al. // *Nat. Med.* 1996. V. 2. № 2. P. 216–223.
40. Ciceri F., Bonini C., Stanghellini M.T.L., Bondanza A., Traversari C., Salomoni M., Turchetto L., Colombi S., Bernardi M., Peccatori J., et al. // *Lancet Oncol.* 2009. V. 10. № 5. P. 489–500.
41. Maury S., Rosenzweig M., Redjoul R., Marcais A., Xhaard A., Cherai M., Cabanne L., Churlaud G., Suarez F., Socié G., et al. // *Leukemia.* 2014. V. 28. № 12. P. 2406–2410.
42. Zhan H., Gilmour K., Chan L., Farzaneh F., McNicol A.M., Xu J.-H., Adams S., Fehse B., Veys P., Thrasher A., et al. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 10. P. e77106.
43. Di Stasi A., Tey S.-K., Dotti G., Fujita Y., Kennedy-Nasser A., Martinez C., Straathof K., Liu E., Durett A.G., Grilley B., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2011. V. 365. № 18. P. 1673–1683.
44. Zhou X., Di Stasi A., Tey S.-K., Krance R.A., Martinez C., Leung K.S., Durett A.G., Wu M.-F., Liu H., Leen A.M., et al. // *Blood.* 2014. V. 123. № 25. P. 3895–3905.
45. Iulucci J.D., Oliver S.D., Morley S., Ward C., Ward J., Dalgarno D., Clackson T., Berger H.J. // *J. Clin. Pharmacol.* 2001. V. 41. № 8. P. 870–879.
46. Straathof K.C., Pulè M.A., Yotnda P., Dotti G., Vanin E.F., Brenner M.K., Heslop H.E., Spencer D.M., Rooney C.M. // *Blood.* 2005. V. 105. № 11. P. 4247–4254.
47. Quintarelli C., Vera J.F., Savoldo B., Giordano Attianese G.M.P., Pule M., Foster A.E., Heslop H.E., Rooney C.M., Brenner M.K., Dotti G. // *Blood.* 2007. V. 110. № 8. P. 2793–2802.
48. Ramos C.A., Asgari Z., Liu E., Yvon E., Heslop H.E., Rooney C.M., Brenner M.K., Dotti G. // *Stem Cells Dayt. Ohio.* 2010. V. 28. № 6. P. 1107–1115.
49. Gargett T., Brown M.P. // *Cytotherapy.* 2015. V. 17. № 4. P. 487–495.
50. Budde L.E., Berger C., Lin Y., Wang J., Lin X., Frayo S.E., Brouns S.A., Spencer D.M., Till B.G., Jensen M.C., et al. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 12. P. e82742.
51. Kieback E., Charo J., Sommermeyer D., Blankenstein T., Uckert W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 2. P. 623–628.
52. Wang X., Chang W.-C., Wong C.W., Colcher D., Sherman M., Ostberg J.R., Forman S.J., Riddell S.R., Jensen M.C. // *Blood.* 2011. V. 118. № 5. P. 1255–1263.
53. Philip B., Kokalaki E., Mekkaoui L., Thomas S., Straathof K., Flutter B., Marin V., Marafioti T., Chakraverty R., Linch D., et al. // *Blood.* 2014. V. 124. № 8. P. 1277–1287.
54. Introna M., Barbui A.M., Bambacioni F., Casati C., Gaipa G., Borleri G., Bernasconi S., Barbui T., Golay J., Biondi A., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2000. V. 11. № 4. P. 611–620.
55. Serafini M., Manganini M., Borleri G., Bonamino M., Imberti L., Biondi A., Golay J., Rambaldi A., Introna M. // *Hum. Gene Ther.* 2004. V. 15. № 1. P. 63–76.
56. Griffioen M., van Egmond E.H.M., Kester M.G.D., Willemze R., Falkenburg J.H.F., Heemskerk M.H.M. // *Haematologica.* 2009. V. 94. № 9. P. 1316–1320.
57. Fedorov V.D., Themeli M., Sadelain M. // *Sci. Transl. Med.* 2013. V. 5. № 215. P. 215ra172.
58. Zhang E., Xu H. // *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol.* 2017. V. 10. № 1. P. 1.
59. Grada Z., Hegde M., Byrd T., Shaffer D.R., Ghazi A., Brawley V.S., Corder A., Schönfeld K., Koch J., Dotti G., et al. // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2013. V. 2. P. e105.
60. Maher J., Brentjens R.J., Gunset G., Rivière I., Sadelain M. // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. № 1. P. 70–75.
61. Seton-Rogers S. // *Nat. Rev. Cancer.* 2016. V. 16. № 3. P. 128–129.
62. Kloss C.C., Condomines M., Cartellieri M., Bachmann M., Sadelain M. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 1. P. 71–75.
63. Wilkie S., van Schalkwyk M.C.I., Hobbs S., Davies D.M., van der Stegen S.J.C., Pereira A.C.P., Burbidge S.E., Box C., Eccles S.A., Maher J. // *J. Clin. Immunol.* 2012. V. 32. № 5. P. 1059–1070.
64. Morsut L., Roybal K.T., Xiong X., Gordley R.M., Coyle S.M., Thomson M., Lim W.A. // *Cell.* 2016. V. 164. № 4. P. 780–791.
65. Wu C.-Y., Roybal K.T., Puchner E.M., Onuffer J., Lim W.A. // *Science.* 2015. V. 350. № 6258. P. aab4077.
66. Uhlen M., Oksvold P., Fagerberg L., Lundberg E., Jonasson K., Forsberg M., Zwahlen M., Kampf C., Wester K., Hober S., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 28. № 12. P. 1248–1250.
67. Campoli M., Ferrone S. // *Oncogene.* 2008. V. 27. № 45. P. 5869–5885.
68. Ginhoux F., Turbant S., Gross D.A., Poupiot J., Marais T., Lone Y., Lemonnier F.A., Firat H., Perez N., Danos O., et al. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2004. V. 10. № 2. P. 279–289.
69. Sakemura R., Terakura S., Watanabe K., Julamanee J., Takagi E., Miyao K., Koyama D., Goto T., Hanajiri R., Nishida T., et al. // *Cancer Immunol. Res.* 2016. V. 4. № 8. P. 658–668.
70. Choi J., Chen J., Schreiber S.L., Clardy J. // *Science.* 1996. V. 273. № 5272. P. 239–242.
71. Bayle J.H., Grimley J.S., Stankunas K., Gestwicki J.E., Wandless T.J., Crabtree G.R. // *Chem. Biol.* 2006. V. 13. № 1. P. 99–107.
72. Bishop A., Buzko O., Heyeck-Dumas S., Jung I., Kraybill B., Liu Y., Shah K., Ulrich S., Witucki L., Yang F., et al. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2000. V. 29. P. 577–606.
73. Banaszynski L.A., Chen L.-C., Maynard-Smith L.A., Ooi A.G.L., Wandless T.J. // *Cell.* 2006. V. 126. № 5. P. 995–1004.
74. Park J.S., Rhau B., Hermann A., McNally K.A., Zhou C., Gong D., Weiner O.D., Conklin B.R., Onuffer J., Lim W.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 16. P. 5896–5901.
75. Tamada K., Geng D., Sakoda Y., Bansal N., Srivastava R., Li Z., Davila E. // *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2012. V. 18. № 23. P. 6436–6445.
76. Urbanska K., Lanitis E., Poussin M., Lynn R.C., Gavin B.P., Kelderman S., Yu J., Scholler N., Powell D.J. // *Cancer Res.* 2012. V. 72. № 7. P. 1844–1852.
77. Rodgers D.T., Mazagova M., Hampton E.N., Cao Y., Ramadoss N.S., Hardy I.R., Schulman A., Du J., Wang F., Singer O., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 4. P. E459–468.
78. 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., et al. // *Lancet Lond. Engl.* 2015. V. 385. № 9967. P. 517–528.
79. Evans A.G., Rothberg P.G., Burack W.R., Huntington S.F., Porter D.L., Friedberg J.W., Liesveld J.L. // *Br. J. Haematol.* 2015. V. 171. № 2. P. 205–209.
80. Clémenceau B., Congy-Jolivet N., Gallot G., Vivien R., Gaschet J., Thibault G., Vié H. // *Blood.* 2006. V. 107. № 12. P. 4669–4677.

81. Kudo K., Imai C., Lorenzini P., Kamiya T., Kono K., Davidoff A.M., Chng W.J., Campana D. // *Cancer Res.* 2014. V. 74. № 1. P. 93–103.
82. D'Aloia M.M., Caratelli S., Palumbo C., Battella S., Arriga R., Lauro D., Palmieri G., Sconocchia G., Alimandi M. // *Cytotherapy.* 2016. V. 18. № 2. P. 278–290.
83. Ma J.S.Y., Kim J.Y., Kazane S.A., Choi S.-H., Yun H.Y., Kim M.S., Rodgers D.T., Pugh H.M., Singer O., Sun S.B., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 4. P. E450–458.
84. Cao Y., Rodgers D.T., Du J., Ahmad I., Hampton E.N., Ma J.S.Y., Mazagova M., Choi S.-H., Yun H.Y., Xiao H., et al. // *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2016. V. 55. № 26. P. 7520–7524.
85. Skerra A. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007. V. 18. № 4. P. 295–304.
86. Kim M.S., Ma J.S.Y., Yun H., Cao Y., Kim J.Y., Chi V., Wang D., Woods A., Sherwood L., Caballero D., et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. V. 137. № 8. P. 2832–2835.
87. Shimizu Y., van Seventer G.A., Horgan K.J., Shaw S. // *Immunol. Rev.* 1990. V. 114. P. 109–143.
88. Salmon H., Franciszkievicz K., Damotte D., Dieu-Nosjean M.-C., Validire P., Trautmann A., Mami-Chouaib F., Donna-dieu E. // *J. Clin. Invest.* 2012. V. 122. № 3. P. 899–910.
89. Han X., Bryson P.D., Zhao Y., Cinay G.E., Li S., Guo Y., Siriwon N., Wang P. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2017. V. 25. № 1. P. 274–284.
90. Zhao Y., Moon E., Carpenito C., Paulos C.M., Liu X., Brennan A.L., Chew A., Carroll R.G., Scholler J., Levine B.L., et al. // *Cancer Res.* 2010. V. 70. № 22. P. 9053–9061.
91. Barrett D.M., Zhao Y., Liu X., Jiang S., Carpenito C., Kalos M., Carroll R.G., June C.H., Grupp S.A. // *Hum. Gene Ther.* 2011. V. 22. № 12. P. 1575–1586.
92. Maus M.V., Haas A.R., Beatty G.L., Albelda S.M., Levine B.L., Liu X., Zhao Y., Kalos M., June C.H. // *Cancer Immunol. Res.* 2013. V. 1. P. 26–31.
93. Beatty G.L., Haas A.R., Maus M.V., Torigian D.A., Soulen M.C., Plesa G., Chew A., Zhao Y., Levine B.L., Albelda S.M., et al. // *Cancer Immunol. Res.* 2014. V. 2. № 2. P. 112–120.