

УДК 571.27

Основы дизайна химерных антигенных рецепторов

С. В. Кулемзин^{1#}, В. В. Кузнецова^{1#}, М. Мамонкин³, А. В. Таранин^{1,2}, А. А. Горчаков^{1,2*}¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8/2²Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2³Center for Cell and Gene Therapy, Baylor College of Medicine, Texas Children's Hospital and Houston Methodist Hospital, Houston, TX, USA

#Эти авторы внесли равный вклад в выполнение работы.

*E-mail: gorchakov@mcb.nsc.ru

Поступила в редакцию 23.06.2016

Принята к печати 17.11.2016

РЕФЕРАТ Химерные антигенные рецепторы представляют собой рекомбинантные трансмембранные молекулы, которые перенаправляют цитотоксические лимфоциты на клетки опухоли. Возможность сравнительно быстро получать опухоль-специфичные Т-клетки с химерными антигенными рецепторами для адоптивной иммунотерапии опухолей делает актуальным изучение структур, которые обеспечивают максимальную функциональность рецепторов *in vivo*. В обзоре приведена информация об основных элементах химерных антигенных рецепторов, а именно об антигенраспознающем модуле, шарнирной области, трансмембранном районе и сигнальных последовательностях. Обсуждается возможное влияние тех или иных участков химерных антигенных рецепторов на их активность *in vitro* и *in vivo*, рассмотрены также альтернативные варианты дизайна химерных антигенных рецепторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА адоптивная иммунотерапия, рак, Т-клетки, химерный антигенный рецептор.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CAR – химерный антигенный рецептор; TCR – Т-клеточный рецептор; mAT – моноклональное антитело; scFv – одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела; scFv-CAR – химерный антигенный рецептор с антигенраспознающей областью, основанной на scFv; DARPIn – искусственный белок с анкириновыми повторами; FITC – флуоресцеинизотиоцианат; VHH – рекомбинантные однодоменные антитела верблюдовых (наноантитела); VLR – вариабельные лимфоцитарные рецепторы круглоротых; MHC – белки главного комплекса гистосовместимости; ITAM – тирозинсодержащий активационный мотив.

ВВЕДЕНИЕ

Современные методы перенацеливания клеток иммунной системы открывают значительные возможности для терапии онко- и аутоиммунных заболеваний. В последние годы наиболее успешно с этой целью используют так называемые химерные антигенные рецепторы (CAR), представляющие собой искусственные молекулы, которые обеспечивают активацию несущих их клеток при контакте с определенным антигеном. Антигенраспознающая часть CAR представлена, как правило, фрагментом моноклонального антитела (mAT), она взаимодействует с опухолевыми детерминантами без участия молекул MHC, а активация обеспечивается сигнальными мотивами во внутриклеточной части CAR. В качестве клеток-носителей CAR обычно используют Т-клетки (далее CAR Т-клетки). В данном обзоре структурные особенности CAR рассмотрены именно в контексте Т-клеток, хотя существуют и альтернативные кле-

точные платформы (NK-клетки, iNKT-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки).

В общем виде схему терапии CAR Т-клетками можно представить следующим образом (рис. 1). В полученные от пациента первичные Т-клетки вводят ДНК-кассету, кодирующую CAR; трансгенные CAR Т-клетки *ex vivo* размножают и возвращают в организм пациента, где они при помощи антигенраспознающей части CAR взаимодействуют с опухолевыми антигенами, а внутриклеточная часть CAR индуцирует активацию Т-клеток, что приводит к лизису опухолевых клеток и пролиферации CAR Т-клеток. Таким образом, этот подход сочетает селективность антител и цитотоксический потенциал Т-лимфоцитов.

Терапию CAR Т-клетками начали применять относительно недавно, однако уже получены многообещающие результаты. В ряде испытаний удалось добиться ремиссии более чем у половины пациентов

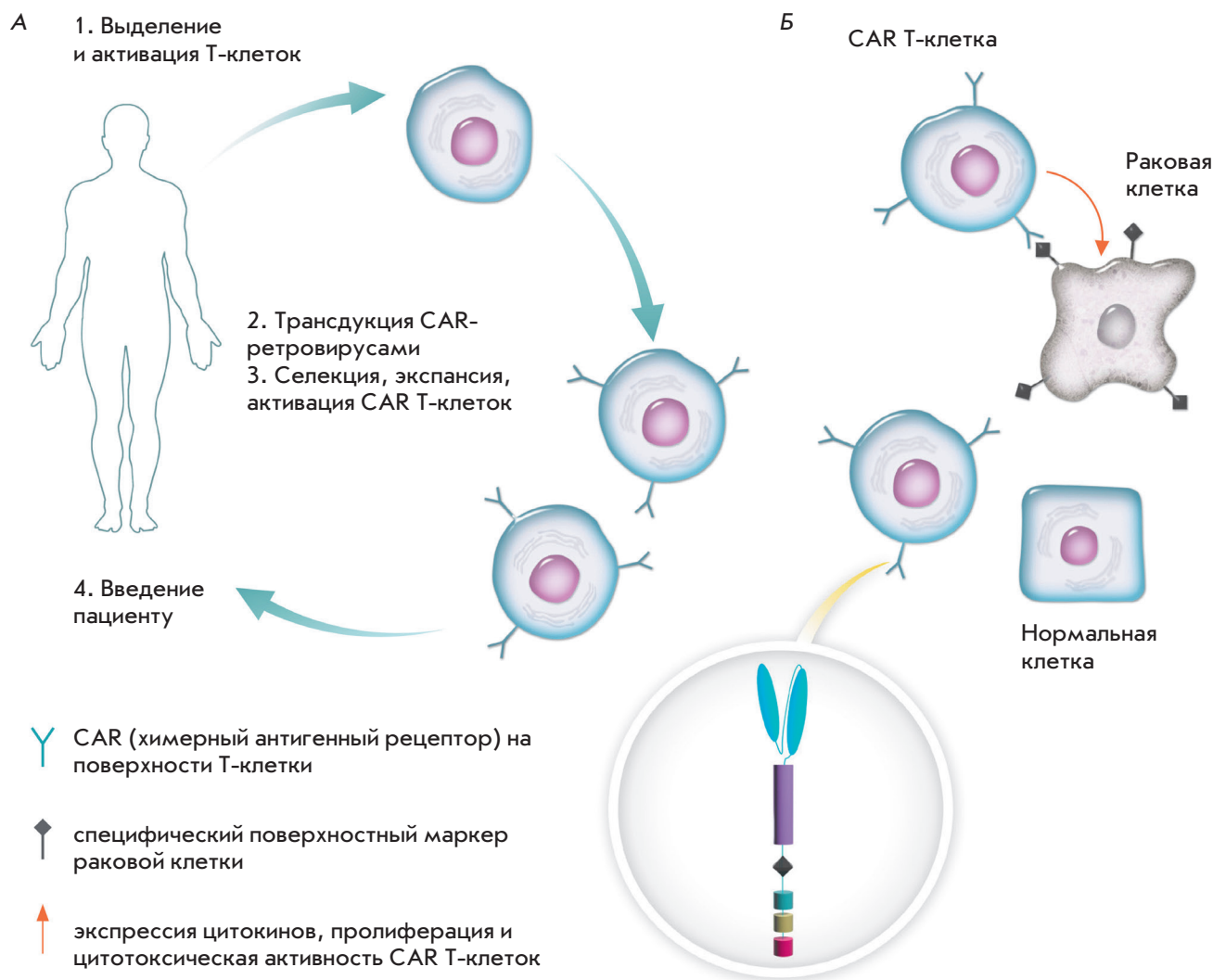


Рис. 1. Принцип адоптивного переноса CAR Т-клеток и функционирование CAR-платформы. При помощи процедуры лейкофереза Т-клетки периферической крови онкобольного отбирают для культивирования *ex vivo*. После трансдукции Т-клеток кодирующими CAR ленти- или гаммаретровирусами отбирают CAR-позитивные клетки, размножают и активируют перед возвращением в организм пациента (А). При встрече CAR Т-клетки и трансформированной клетки, несущей целевой белок-мишень на поверхности, CAR Т-клетки активируются, что приводит к секреции цитокинов, пролиферативной реакции и уничтожению клетки-мишени (Б)

с опухолями, устойчивыми к другим видам терапии [1]. В то же время обозначились и первые трудности, связанные с недостаточной селективностью CAR [2].

СТРОЕНИЕ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Разработанные в середине 1980-х годов CAR представляли собой переменные (антигенсвязывающие) участки антител, слитые с константной частью Т-клеточного рецептора (TCR) [3]. В 1993 З. Эшхар и соавт. модифицировали эту структуру: в качестве антигенраспознающего домена они использовали со-

единенные линкером переменные районы легкой и тяжелой цепей антител (scFv, single chain variable fragment), а трансмембранный домен и сигнальная внутриклеточная последовательность были заимствованы у CD3ζ или Fcγ, причем весь химерный рецептор состоял из одной полипептидной цепочки [4]. Следующие поколения CAR имели в целом сходную структуру, но несли дополнительные сигнальные домены для повышения Т-клеточной активности. Далее будут рассмотрены основные структурные элементы CAR.

АНТИГЕНРАСПОЗНАЮЩИЙ ДОМЕН CAR

Формат scFv

В подавляющем большинстве случаев в качестве антигенраспознающего модуля CAR используют производные антител в виде scFv [5] (рис. 2). Несомненно, это достаточно удобный формат, поскольку взятые за основу scFv МАТ чаще всего уже хорошо охарактеризованы на доклинических моделях или, более того, разрешены к применению в клинике. Таким образом, при использовании CAR с ранее проверенным scFv риск неожиданной перекрестной реакции CAR Т-клеток со здоровыми тканями гораздо меньше, хоть и не равен нулю. Помимо этого, для многих таких антител получены данные структурного анализа, что позволяет направленно изменять аффинность scFv-CAR в ту или иную сторону. Из недостатков scFv

в качестве антигенраспознающего модуля CAR следует отметить возможность развития иммунной реакции против мышинных и линкерных последовательностей в составе scFv [6] и сложность конструирования полиспецифических scFv-CAR (ввиду большого размера и стабилизации структуры за счет дисульфидных связей) [7]. Кроме того, каркасные последовательности антител в составе scFv могут вызывать лиганднезависимую кластеризацию CAR, что приводит к так называемой тонической сигнализации, неспецифической активации и, как следствие, к раннему истощению и потере функциональности модифицированных Т-клеток. Протестировав склонность нескольких scFv-CAR (против CD19, GD2, CD22, HER2) к самоассоциации, А. Лонг и соавт. обнаружили, что только CD19-специфичный CAR был полностью лишен этого свойства [8].

Опухолевые мишени, против которых созданы CAR

Опробованы в клинике:

BCMA, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD123, CD133, CEA, EGFR, EGFRvIII, EphA2, ErbB-семейство, GPC3, HER2 (ERBB2), FAP, FR α , GD2, Ig κ , IL13R α 2, Mesothelin, Muc1, PSMA, ROR1, VEGFR2

Находятся на доклинической стадии:

B7-H3 (CD276), B7H6 (NCR3LG1), CD5, CD23, CD70, CSPG4, EpCAM, GD3, HLA-A1+MAGE, IL11R α , Lewis-Y, Muc16, лиганды NKG2D, PSCA, TAG72

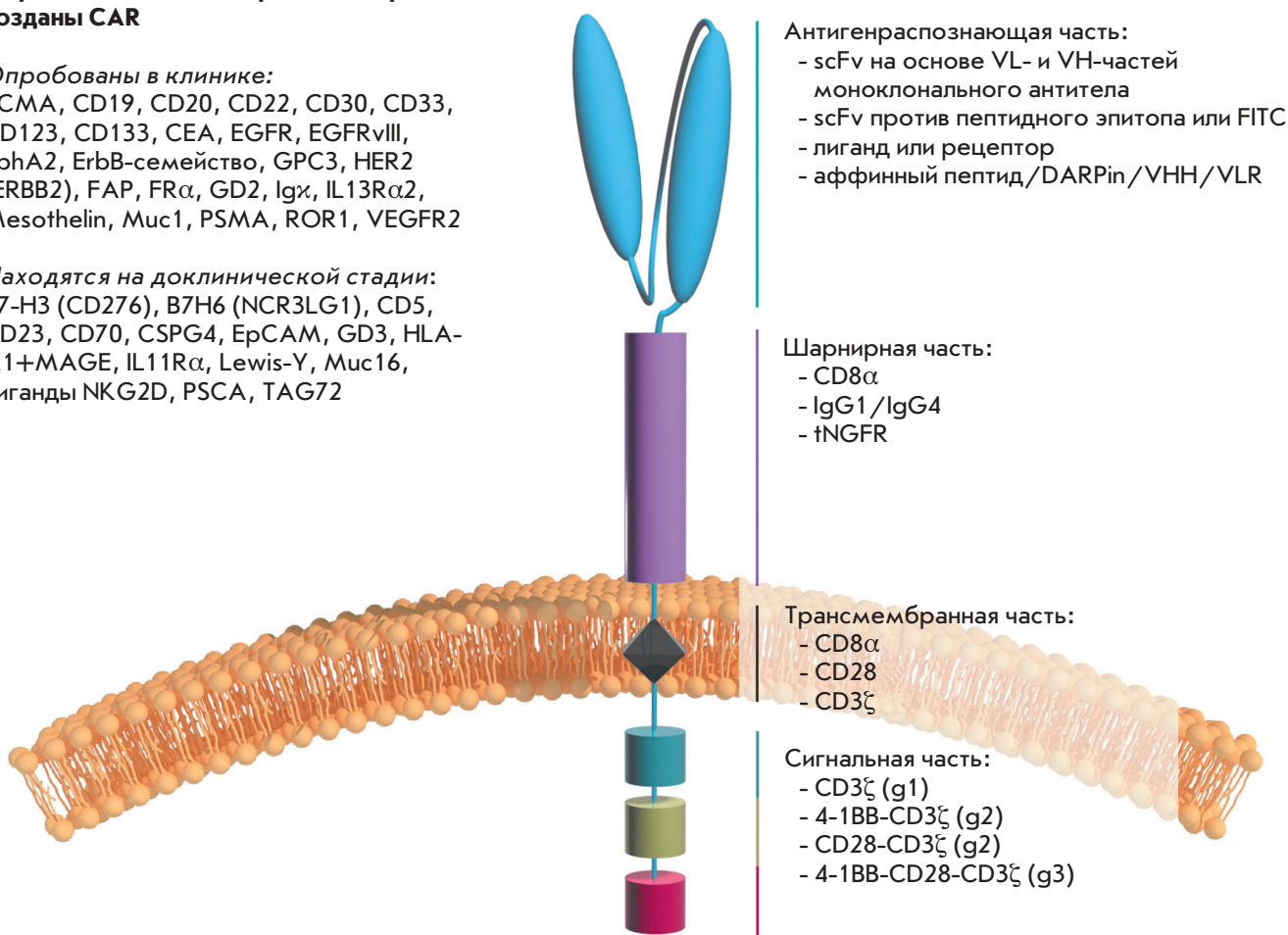


Рис. 2. Организация CAR (в мономерном виде). Рецепторы первого (g1), второго (g2) и третьего (g3) поколений отличаются наличием и числом костимулирующих последовательностей

Естественные лиганд-рецепторные пары

Значительная часть CAR, клинически протестированных к настоящему времени, содержит негуманизированные scFv мыши, в связи с чем возникает риск развития иммунного ответа, который может блокировать CAR-терапию и вызывать анафилактический шок [9]. Отчасти из-за этого активное развитие получили альтернативные варианты дизайна антигенраспознающих модулей CAR, в которых используются естественные, заведомо неиммуногенные пары рецептор/лиганд. Например, известно, что на поверхности клеток глиобластомы, рака яичника и поджелудочной железы зачастую повышена экспрессия рецептора IL13 – IL13R α 2 [10, 11]. Воспользовавшись этой информацией, из последовательностей, кодирующих IL13, удалось создать химерные рецепторы, специфично узнающие IL13R α 2 (впоследствии было показано, что они узнавали и IL13R α 1) [12–15]. Антигенраспознающие районы CAR, специфичные к лигандам NKG2D и молекуле CD70, сконструированы с использованием внеклеточной части NKG2D и CD27 (рецептора CD70) соответственно [16–18]. CAR, узнающие HER3 (ErbB3) и HER4 (ErbB4), удалось получить, позаимствовав внеклеточные последовательности изоформ α и β белка нейрегулин-1 [19, 20]. Наконец, созданы CAR с последовательностями CD4 [21–23], VEGF [24], NKp30 [25] в качестве антигенраспознающих модулей (мишени gp120 HIV, VEGFR2 и B7H6 соответственно).

Необходимо отметить, что в целом CAR, основанные на лиганд-рецепторных взаимодействиях, страдают от того же недостатка, что и построенные с использованием scFv: мишени таких рецепторов не являются сугубо опухолеспецифичными и присутствуют, хоть и в меньшем количестве, на поверхности нормальных клеток. Кроме того, как показывает опыт, рецептор или лиганд редко имеют только одного партнера – как правило, их несколько, поэтому, чтобы исключить возможность непреднамеренной активации CAR T-клеток от встречи с такими молекулами, требуется серьезная структурно-функциональная оптимизация.

Пептидные лиганды

В качестве антигенраспознающих доменов химерных рецепторов успешно используются пептидные лиганды. Несмотря на потенциальную иммуногенность таких пептидов, риск развития иммунного ответа на них ниже, чем на значительно более крупные scFv. Д.М. Дэвис и соавт. получили CAR, содержащий в качестве внеклеточного домена пептидный лиганд T1E, который распознает клетки-мишени, экспрессирующие на своей поверхности рецепторы семейства ErbB [26]. В работе Памейер и соавт. 12-мерный пеп-

тид ВРЕР в контексте CAR позволял успешно распознавать и уничтожать клетки-мишени рака яичника с поверхностной экспрессией интегрина α v β 6 [27]. Схожую схему успешно опробовали и на паре IL11R α /нонапептид IL11 (повышенная экспрессия IL11R α характерна для клеток остеосаркомы, рака желудка и кишечника, молочной и предстательной железы) [28]. Такие «пептидные» CAR пока находятся на стадии «проверки концепции» и доклинических исследований.

Родственным подходом является использование CAR, антигенраспознающая часть которых представлена искусственными анкириновыми повторами (DARPin, designed ankyrin repeat proteins) [29, 30], наноантителами (VHH) [31–34] или VLR (variable lymphocyte receptors) [35]. DARPin – компактные и стабильные белковые модули, отселектированные на высокоаффинное связывание с одной или несколькими мишенями. Так, показано, что HER2-специфичные DARPin-CAR работают (т.е. вызывают активацию и цитотоксическую реакцию) не хуже, чем «классические» scFv-CAR против той же мишени. Описана функциональность VHH и VLR в качестве антигенраспознающих модулей CAR. К важным преимуществам этой системы относится модульность и меньший размер DARPin/VHH/VLR по сравнению с scFv, что, в свою очередь, предполагает возможность создания полиспецифических и/или поливалентных CAR, узнающих несколько мишеней. Тем не менее декларируемая низкая иммуногенность DARPin/VHH/VLR-CAR пока не показана и может представлять определенную проблему при переходе к клиническим испытаниям.

Универсальные антигенраспознающие модули

Известно, что популяция опухолевых клеток, как правило, гетерогенна по поверхностным маркерам-мишеням, в связи с чем CAR T-клетки могут распознавать их с разной эффективностью: они не будут уничтожать те клетки, экспрессия целевой мишени на которых снизилась или вовсе отсутствует. Таким образом, разумно создавать CAR T-клетки, специфичность которых относительно легко изменить, используя богатый арсенал имеющихся мАТ. К настоящему времени опубликовано три варианта дизайна так называемых универсальных антигенраспознающих модулей CAR.

В первом варианте в качестве антигенраспознающей части используется димер авидина курицы [36] – белка, который с высокой аффинностью связывается с биотином и биотинилированными молекулами. Введение мышам таких универсальных CAR T-клеток и биотинилированных антител против поверхностных антигенов опухолевых клеток-мишеней

приводит к эффективному и специфическому уничтожению этих клеток. Более того, последовательное введение биотинилированных антител против других мишеней приводит к соответствующему изменению (перенаправлению) активности CAR T-клеток. Интересно отметить, что свободный биотин, неизменно присутствующий в плазме крови, не препятствует этому эффекту и не вызывает неспецифической аутоактивации CAR T-клеток. Использование CAR с scFv против пептидного неоэпитопа и мишень-специфических антител, содержащих этот неоэпитоп [37], позволяет добиться того же эффекта универсальности.

Во втором варианте универсальных химерных рецепторов использованы scFv, специфически связывающиеся с FITC. Принцип действия антиFITC-CAR T-клеток сходен с описанным выше: такие клетки связываются с mAT или scFv, конъюгированными с FITC, за счет чего начинают узнавать и уничтожать соответствующие этим антителам клетки [38, 39].

Наконец, в третьей системе универсальных CAR использован эффект мимикрии CAR T-клеток под NK-клетки, способные проявлять антитело-зависимую клеточную цитотоксичность по отношению к перерожденным или зараженным клеткам. Как только с поверхностью клетки-мишени связывается антитело, его Fc-часть узнается CD16a (FcγRIIIA). Известно, что примерно 40% людей являются носителями полиморфизма F158V в CD16a [40], значительно увеличивающего аффинность такого рецептора к антителам [41, 42]. Использование внеклеточной части этого рецептора в качестве антигенраспознающего модуля позволило создать «универсальный» CAR, способный перенаправлять цитотоксическую активность T-клеток в соответствии с вводимыми противоопухолевыми антителами [43–45]. Потенциальной проблемой при применении этого подхода может быть то, что увеличение аффинности CAR к антителам будет неминуемо сопровождаться вытеснением вводимых терапевтических антител свободными антителами плазмы крови. Так это или нет, покажут результаты проводимых в настоящее время клинических испытаний эффективности CD16-CAR T-клеток в сочетании с ритуксимабом (mAT против CD20) при CD20-положительных неходжкинских лимфомах и хроническом лимфолейкозе.

Таким образом, описанное «универсальное» решение имеет два основных преимущества: а) специфичность CAR T-клеток удобно контролировать (менять при необходимости или сразу вводить несколько антител против разных мишеней); б) такие клетки легко «выключить», просто перестав вводить антитела.

С другой стороны, очевидным препятствием для перехода к клиническим испытаниям пер-

вых двух систем является потенциальная иммуногенность авидина, неоэпитопного пептида и FITC. Возможно, значимость этой проблемы не столь велика, поскольку иммунная система онкологических больных, как правило, находится в крайне угнетенном состоянии. Еще одну проблему представляет ограниченное проникновение антител в разные органы и ткани, что может значительно снижать их эффективную концентрацию в солидных опухолях, т.е. применительно к таким формам рака эти системы, по-видимому, имеют те же недостатки, что и таргетные «антительные» подходы.

Шарнирная область CAR

При взаимодействии T-лимфоцита и антигенпредставляющей клетки между ними формируется иммунологический синапс с расстоянием между мембранами около 15 нм [46]. Это расстояние диктуется структурой TCR и комплекса пептид+MHC, оно определяет закрытую структуру синапса и обеспечивает исключение из него молекул, длина внеклеточной части которых превышает 15 нм. Как оказалось, такое пространственное разделение важно для эффективного запуска каскада фосфорилирования и активации T-клеток [47, 48]. Так, фосфатаза CD45 обладает достаточно крупной внеклеточной частью, и при искусственном укорочении этот белок получает возможность остаться в пределах синапса, что влечет за собой супрессию активационных сигналов [49, 50]. Расстояние между CAR T-клеткой и опухолевой клеткой может играть важную роль в обеспечении адекватной активации эффекторных функций. Поскольку взаимное расположение эпитопа на молекуле-мишени и антигенраспознающей области химерного рецептора в контексте CAR T-клетки задает размер образующегося синапса, становится ясно, почему этот нюанс дизайна может определять, будет ли такой рецептор функциональным или нет [51, 52]. Например, в работе А.А. Хомбах и соавт. было показано, что CAR T-клетки, распознающие дистальный по отношению к мембране эпитоп ракового эмбрионального антигена (CEA), активировались на среднем уровне, тогда как тот же антиген, перенесенный в более проксимальное положение, активировал CAR T-клетки с большей силой [53]. Сходным образом CAR T-клетки с scFv, специфичным к более проксимальному по отношению к мембране эпитопу CD22 (антиген, обильно представленный на нормальных и злокачественных В-клетках), показали высокую противолейкозную активность в отличие от CAR T-клеток, нацеленных на распознавание дистального эпитопа [54, 55]. Эти и некоторые другие примеры ([56], обзор [57]) свидетельствуют о том, что дистально расположенные эпитопы

в целом приводят к формированию синапса большего размера, чем оптимальные 15 нм, в результате чего становится возможным включение в него фосфатаз CD45 и CD148, что, в свою очередь, приводит к ингибированию активационного сигнала.

Таким образом, поскольку положение эпитопа, узнаваемого конкретным scFv, на поверхности клетки-мишени всегда фиксировано, для обеспечения его максимальной стерической совместимости с scFv, а также для создания компактного синапса необходим эмпирический подбор внеклеточного спейсера (шарнирного района) между поверхностью Т-клетки и антигенраспознающим модулем.

В качестве спейсера наиболее часто используют последовательности CD8 α , CD28 и IgG1/IgG4 (hinge-Fc часть) (в единичных работах – CD4, CD7 и IgD) [58–61], обзор [62]. Такой выбор обусловлен тем, что эти последовательности относительно нейтральны, хорошо структурно охарактеризованы и обладают необходимой гибкостью. Тем не менее выяснилось, что CD8 α -шарнир работает не для всех scFv-CAR, Fc-фрагмент IgG биологически далеко не инертен, и нежелательные эффекты спейсера начинают проявляться как только исследования переходят в фазу *in vivo*. Так, показано, что происходит взаимное узнавание клеток с IgG-содержащими химерными рецепторами и клеток, экспрессирующих Fc-рецепторы (макрофагов, моноцитов и NK-клеток). Соответственно IgG-CAR Т-клетки неспецифически возбуждаются в отсутствие антигена и проявляют цитотоксичность по отношению к FcR γ ⁺ клеткам, которые, в свою очередь, активируются и уничтожают CAR Т-клетки, что, разумеется, сказывается на эффективности и безопасности проводимой терапии [63, 64]. Один из способов решения этой проблемы – использование вариантов IgG-шарниров, заведомо неспособных связываться с Fc-рецепторами (с удаленным CH2-доменом или мутированными ключевыми аминокислотными остатками) [63–66].

Интересно, что все используемые варианты шарниров CAR – это последовательности, склонные к гомо- или гетеродимеризации, поэтому не очень ясно, насколько возникающие при этом постоянные лиганднезависимые сигналы (tonic/ligand-independent signalling) от таких рецепторов «помогают» или «мешают» CAR Т-клеткам. По умолчанию считается, что димеризация CAR обеспечивает лучшее удержание CAR на поверхности (обзор [67]). Данные, полученные *in vitro*, указывают на то, что димеризация CAR не влияет существенно на активацию CAR Т-клеток [14, 68, 69], а эксперименты, позволяющие адекватно сравнивать функциональность димеризующихся и недимеризующихся CAR *in vivo*, пока не проведены. Отметим, что относительно

но недавно получены функциональные варианты CAR с шарнирным районом из последовательности NGFR/p75 [70] – такие рецепторы не только не узнаются сторонними клетками, но и не способны к димеризации. Кроме того, NGFR-спейсер может выполнять функцию удобного для детекции эпитопа, что упрощает не только селекцию и экспансию CAR Т-клеток, но при необходимости может быть использовано для оперативного уничтожения таких CAR Т-клеток в организме реципиента.

Трансмембранный домен

Основная функция трансмембранного домена – позиционировать рецептор на поверхности клетки. Как правило, этот домен конструируют из последовательностей, заимствованных из трансмембранных участков CD3 ζ , CD28, CD8, FcRI γ , реже из CD4, CD7, OX40 и MHC(H2-Kb), – выбор в значительной мере определяется тем, какие спейсерные или внутриклеточные последовательности располагаются рядом (обзор [71]). Показано, что трансмембранные районы на основе CD3 ζ и FcRI γ обеспечивают эффективное включение CAR в состав эндогенного TCR. Причем именно за счет этого взаимодействия CAR без ITAM-мотивов или вообще без сигнальных последовательностей оказываются вполне функциональными [69, 72–74]. Таким образом, дизайн CAR, обеспечивающий их включение или исключение из TCR, равно как вовлечение дополнительных корецепторов, должен приводить не только к количественным, но и к качественным различиям в генерируемых сигналах, что требует дальнейшего изучения.

Сигнальный (внутриклеточный) домен

Функция сигнального домена CAR – передавать активационный сигнал Т-клетке как только произошло распознавание антигена его внеклеточной частью. В норме активация Т-клеток происходит за счет фосфорилирования ITAM, находящихся в цитоплазматической части цепи CD3 ζ из комплекса TCR [75]. Соответственно в большинстве случаев для конструирования CAR в качестве домена, запускающего литическую активность клетки, используют именно сигнальный район CD3 ζ . Ранее в этом качестве были опробованы ITAM-содержащие домены других сигнальных субъединиц (например, FcR γ) [4], но они менее эффективно активировали цитотоксические функции модифицированных Т-лимфоцитов [76, 77]. Индукция активирующего сигнала в нативных Т-лимфоцитах происходит в несколько этапов. Сначала активная форма киназы LCK фосфорилирует ITAM-мотивы в цитоплазматической части CD3 ζ , что активирует киназу ZAP-70, которая запускает сразу несколько активирующих сигнальных каска-

дов. Перечисленные события называют «сигнал 1», но для полноценной активации Т-клетки необходим также «сигнал 2» [78]. Источниками второго сигнала являются костимулирующие рецепторы, например CD28, связывание которого с CD80/CD86 вызывает активацию PI3K и запуск PI3K-зависимого сигнального пути, который, в свою очередь, инициирует mTOR-каскад, определяющий пролиферативную активность клетки.

Таким образом, первое поколение CAR, содержащее только CD3 ζ -цепь, посылало в клетку исключительно «сигнал 1», что индуцировало цитотоксичность опухоли [79], но не обеспечивало усиленную пролиферацию активированных CAR Т-клеток. «Сигнал 2» мог бы поступить в клетку от нативных рецепторов CAR Т-клетки, однако, многие опухолевые клетки не экспрессируют соответствующих им лигандов. Чтобы преодолеть эту сложность, в 1998 году Х. Финни и соавт. предложили CAR «второго поколения», в котором цитоплазматическая часть содержала сигнальный участок CD28 вместе с CD3 ζ . Такой CAR обеспечивает клетку и «сигналом 1», и «сигналом 2», в результате чего клетка активируется, уничтожает мишень и пролиферирует [58, 80, 81]. Кроме CD28 в состав CAR вводили также сигнальные участки от таких костимулирующих рецепторов, как CD134 (TNFRSF4, OX40), CD154 (CD40L), CD137 (4-1BB), ICOS (CD278), CD27, CD244 (2B4) и другие [82–88]. Природа костимулирующих последовательностей (принадлежность к IgSF-или TNFRSF-семействам) прямо влияла на характер и динамику функционирования CAR Т-клеток [82, 89]. Дальнейший прогресс в разработке сигнальной части CAR привел к комбинированию двух или более костимулирующих последовательностей (наиболее частая – 4-1BB-CD28-CD3 ζ). Такие рецепторы, называемые CAR третьего поколения, секретируют более широкий спектр цитокинов (включая TNF α , GM-CSF и IFN γ), меньше подвержены индуцируемой активацией клеточной смерти и эффективнее уничтожают опухоли в мышиных моделях [90–92]. Несмотря на эти оптимистичные результаты, пока недостаточно данных, чтобы делать выводы о большей клинической эффективности CAR третьего поколения [93].

Наиболее частым вариантом CAR для клинического применения продолжает оставаться CAR второго поколения с последовательностями CD28-CD3 ζ или 4-1BB-CD3 ζ [94–97]. Как показано в клинических испытаниях и на доклинических моделях, использование CD28-CD3 ζ -сигнализирующих рецепторов разной специфичности ведет к взрывной экспансии CAR Т-клеток *in vivo*, но одновременно ускоряет истощение эффекторов и наступление их

терминальной дифференцировки, что, в свою очередь, приводит к ограниченному персистенцированию в организме и отсутствию достаточного противоопухолевого эффекта [8, 98]. При этом динамика пролиферации клеток с 4-1BB-CD3 ζ -содержащими CAR имеет более плавный характер: 4-1BB-домен обеспечивает иной характер активации и «ослабляет» эффект раннего истощения клеток-эффекторов. Соответственно 4-1BB-CD3 ζ CAR Т-клетки значительно дольше поддерживаются в организме, обеспечивая тем самым более длительный и надежный противоопухолевый контроль [87, 89, 99], обзор [100]. В то же время недавно обнаружили, что комбинация CD28-опосредованной костимуляции в контексте CD28-CD3 ζ -CAR и 4-1BB-костимуляции (коэкспрессия лиганда 4-1BB) сочетает в себе все достоинства обоих путей и функционирует эффективнее, чем любой из «классических» CAR-дизайнов, в том числе и 4-1BB-CD28-CD3 ζ -содержащий рецептор третьего поколения [101]. Аналогичный подход – использование контролируемой костимуляции для усиления функциональности CAR Т-клеток, лежит в основе GoCAR-T-технологии (Bellicum Pharmaceuticals). За счет коэкспрессии гибридной молекулы iMyD88-CD40 (iMC) и CAR первого поколения вовлекается более широкий набор активационных механизмов, и GoCAR-T-клетки, как следует из сообщений компании, активнее пролиферируют и уничтожают опухолевые клетки *in vitro* и *in vivo*.

По всей видимости, не существует универсального решения при создании CAR-конструкций, поскольку в разных типах новообразований оптимально работают различные комбинации сигнальных и костимулирующих модулей, и такие варианты идентифицируют в основном методом проб и ошибок. В этой связи достаточно оригинальной выглядит работа австралийских исследователей, которые создали комбинаторную библиотеку цитоплазматических частей CAR из сочетания 14 сигнальных участков (CD3 ζ , CD28, 4-1BB, CD27, DAP10 и др.) в различном количестве и случайной последовательности. Все случайные цитоплазматические участки экспрессировали в Т-клетках линии Jurkat в составе CAR с одинаковым распознающим модулем. Затем оценивали, какие последовательности вызывают максимальную активацию клеток. В результате обнаружили необычную комбинацию сигнальных последовательностей DAP10-CD3 ζ -CD27, которая *in vitro* работала эффективнее, чем CD28-CD3 ζ [102]. Концептуально близкий подход предложен группой Л. Альварез-Валлина для идентификации оптимальных/новых антигенраспознающих модулей в составе CAR – это так называемый Т-клеточный дисплей, заключающийся в прямом скрининге scFv-библиотек

на поверхности CAR T-клеток [103]. В этом случае scFv-библиотеку в формате химерного антигенного рецептора клонируют в лентивирусный вектор и экспрессируют на поверхности T-клеток при помощи вирусной трансдукции. Полученную таким образом библиотеку scFv-CAR T-клеток инкубируют с трансформированными клетками, несущими интересующую мишень, и после нескольких раундов активации-селекции и контрселекции отбирают лимфоциты, чей химерный рецептор связался с антигеном. Селекцию связавшихся клеток проводят по маркерам активации (фенотип активированных клеток меняется на CD69+), которые начинают экспрессироваться после связывания химерного рецептора с мишенью. Благодаря этому методу отбор scFv можно вести не столько по их аффинности к мишени, сколько непосредственно по способности индуцировать активацию и пролиферацию scFv-CAR T-клеток. Таким образом, важным преимуществом CAR T-клеточного дисплея является то, что отбор CAR происходит сразу в контексте синапса между CAR T-клеткой и клеткой-мишенью, в результате это может быть выгоднее, чем селекция высокоаффинных фрагментов *in vitro* с неизбежной последующей оптимизацией и структурной доработкой в контексте CAR T-клетки. Вместе с тем, необходимо помнить и о важном техническом ограничении T-клеточного дисплея, а именно, о значительном снижении разнообразия скринируемой библиотеки (не выше 10^6 – 10^7). Подобные работы указывают на то, что основным критерием подбора состава и комбинаций модулей CAR должна быть экспериментальная проверка, причем в условиях, максимально приближенных к ситуации *in vivo*: функциональность тех или иных структурных модулей CAR, показанная в системе *in vitro*, далеко не всегда подтверждается в модельных экспериментах с использованием ксено-

трансплантации опухолей и CAR T-клеток мышам, и уж тем более не гарантирует проявления тех же эффектов в клинике. В связи с этим дизайн и тестирование максимально широкого набора вариантов CAR считаются сегодня единственным способом довести хотя бы один из них до терапевтического применения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ввиду очевидного трансляционного потенциала CAR T-клеточной платформы и взрывного роста интереса к этой теме появились разнообразные форматы CAR. Тем не менее, пока получено недостаточно экспериментальных и, в особенности, клинических данных о том, как структура CAR влияет на его свойства *in vivo* и какие модификации обеспечат максимальную клиническую эффективность CAR T-клеточной терапии. Крайне успешное применение CAR T-клеток в области онкогематологии стимулирует попытки адаптации CAR T-клеточной терапии к солидным типам рака, и первые результаты показывают, что, по-видимому, потребуются дальнейшее усложнение технологии. В свою очередь, широкое внедрение этой платформы требует проведения дополнительных систематических исследований и более глубокого понимания всей совокупности механизмов, обеспечивающих формирование и поддержание противоопухолевого иммунитета.

Авторы выражают благодарность А.В. Харкевичу за помощь в подготовке иллюстраций.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 16-14-10237. А.В. Таранин был поддержан программой фундаментальных научных исследований по теме 0310-2015-0006.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gill S., June C.H. // *Immunol. Rev.* 2015. V. 263. № 1. P. 68–89.
- Morgan R.A., Yang J.C., Kitano M., Dudley M.E., Laurencot C.M., Rosenberg S.A. // *Mol. Ther.* 2010. V. 18. № 4. P. 843–851.
- Kuwana Y., Asakura Y., Utsunomiya N., Nakanishi M., Arata Y., Itoh S., Nagase F., Kurosawa Y. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987. V. 149. № 3. P. 960–968.
- Eshhar Z., Waks T., Gross G., Schindler D.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. № 2. P. 720–724.
- Bird R.E., Hardman K.D., Jacobson J.W., Johnson S., Kaufman B.M., Lee S.M., Lee T., Pope S.H., Riordan G.S., Whitlow M. // *Science.* 1988. V. 242. № 4877. P. 423–426.
- Kershaw M.H., Westwood J.A., Parker L.L., Wang G., Eshhar Z., Mavroukakis S.A., White D.E., Wunderlich J.R., Canevari S., Rogers-Freezer L., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2006. V. 12. № 20. Pt 1. P. 6106–6115.
- Worn A., Pluckthun A. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 305. № 5. P. 989–1010.
- Long A.H., Haso W.M., Shern J.F., Wanhainen K.M., Murgai M., Ingaramo M., Smith J.P., Walker A.J., Kohler M.E., Venkateshwara V.R., et al. // *Nat. Med.* 2015. V. 21. № 6. P. 581–590.
- 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. № 1. P. 26–31.
- Mintz A., Gibo D.M., Slagle-Webb B., Christensen N.D., Debinski W. // *Neoplasia.* 2002. V. 4. № 5. P. 388–399.
- Kioi M., Kawakami M., Shimamura T., Husain S.R., Puri R.K. // *Cancer.* 2006. V. 107. № 6. P. 1407–1418.
- Krenciute G., Krebs S., Torres D., Wu M.F., Liu H., Dotti G., Li X.N., Lesniak M.S., Balyasnikova I.V., Gottschalk S. // *Mol. Ther.* 2015. V. 24. № 2. P. 354–363.
- Kahlon K.S., Brown C., Cooper L.J., Raubitschek A., Forman S.J., Jensen M.C. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 24. P. 9160–9166.
- Kong S., Sengupta S., Tyler B., Bais A.J., Ma Q., Doucette S., Zhou J., Sahin A., Carter B.S., Brem H., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2012. V. 18. № 21. P. 5949–5960.

15. Krebs S., Chow K.K., Yi Z., Rodriguez-Cruz T., Hegde M., Gerken C., Ahmed N., Gottschalk S. // *Cytotherapy*. 2014. V. 16. № 8. P. 1121–1131.
16. Zhang T., Lemoi B.A., Sentman C.L. // *Blood*. 2005. V. 106. № 5. P. 1544–1551.
17. Shaffer D.R., Savoldo B., Yi Z., Chow K.K., Kakarla S., Spencer D.M., Dotti G., Wu M.F., Liu H., Kenney S., et al. // *Blood*. 2011. V. 117. № 16. P. 4304–4314.
18. Barber A., Zhang T., Megli C.J., Wu J., Meehan K.R., Sentman C.L. // *Exp. Hematol.* 2008. V. 36. № 10. P. 1318–1328.
19. Altenschmidt U., Kahl R., Moritz D., Schnierle B.S., Gerstmayer B., Wels W., Groner B. // *Clin. Cancer Res.* 1996. V. 2. № 6. P. 1001–1008.
20. Muniappan A., Banapour B., Lebkowski J., Talib S. // *Cancer Gene Ther.* 2000. V. 7. № 1. P. 128–134.
21. Roberts M.R., Qin L., Zhang D., Smith D.H., Tran A.C., Dull T.J., Groopman J.E., Capon D.J., Byrn R.A., Finer M.H. // *Blood*. 1994. V. 84. № 9. P. 2878–2889.
22. Yang O.O., Tran A.C., Kalams S.A., Johnson R.P., Roberts M.R., Walker B.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. № 21. P. 11478–11483.
23. Romeo C., Seed B. // *Cell*. 1991. V. 64. № 5. P. 1037–1046.
24. Niederman T.M., Ghogawala Z., Carter B.S., Tompkins H.S., Russell M.M., Mulligan R.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. № 10. P. 7009–7014.
25. Zhang T., Wu M.R., Sentman C.L. // *J. Immunol.* 2012. V. 189. № 5. P. 2290–2299.
26. Davies D.M., Foster J., van der Stegen S.J., Parente-Pereira A.C., Chiapero-Stanke L., Delinassios G.J., Burbridge S.E., Kao V., Liu Z., Bosshard-Carter L., et al. // *Mol. Med.* 2012. V. 18. P. 565–576.
27. Pameijer C.R., Navanjo A., Meechoovet B., Wagner J.R., Aguilar B., Wright C.L., Chang W.C., Brown C.E., Jensen M.C. // *Cancer Gene Ther.* 2007. V. 14. № 1. P. 91–97.
28. Huang G., Yu L., Cooper L.J., Hollomon M., Huls H., Kleinerman E.S. // *Cancer Res.* 2012. V. 72. № 1. P. 271–281.
29. Binz H.K., Stumpp M.T., Forrer P., Amstutz P., Pluckthun A. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 332. № 2. P. 489–503.
30. Hammill J.A., VanSeggelen H., Helsen C.W., Denisova G.F., Eveleigh C., Tantaló D.G., Bassett J.D., Bramson J.L. // *J. Immunother. Cancer*. 2015. V. 3. P. 55.
31. Jamnani F.R., Rahbarizadeh F., Shokrgozar M.A., Mahboudi F., Ahmadvand D., Sharifzadeh Z., Parhamifar L., Moghimi S.M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1840. № 1. P. 378–386.
32. Sharifzadeh Z., Rahbarizadeh F., Shokrgozar M.A., Ahmadvand D., Mahboudi F., Jamnani F.R., Moghimi S.M. // *Cancer Lett.* 2013. V. 334. № 2. P. 237–244.
33. Zhang G., Liu R., Zhu X., Wang L., Ma J., Han H., Wang X., Zhang G., He W., Wang W., et al. // *Immunol. Cell Biol.* 2013. V. 91. № 10. P. 615–624.
34. Zhang G., Wang L., Cui H., Wang X., Zhang G., Ma J., Han H., He W., Wang W., Zhao Y., et al. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 3571.
35. Moot R., Raikar S.S., Fleischer L., Tylawsky D.E., Nahakara H., Doering C.B., Spencer H.T. // *Mol. Ther. Oncolytics*. 2016. V. 3. P. 16026.
36. Urbanska K., Lanitis E., Poussin M., Lynn R.C., Gavin B.P., Kelderman S., Yu J., Scholler N., Powell D.J., Jr. // *Cancer Res.* 2012. V. 72. № 7. P. 1844–1852.
37. 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–E468.
38. Tamada K., Geng D., Sakoda Y., Bansal N., Srivastava R., Li Z., Davila E. // *Clin. Cancer Res.* 2012. V. 18. № 23. P. 6436–6445.
39. Ma J.S., 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–E458.
40. Wu J., Edberg J.C., Redecha P.B., Bansal V., Guyre P.M., Coleman K., Salmon J.E., Kimberly R.P. // *J. Clin. Invest.* 1997. V. 100. № 5. P. 1059–1070.
41. Koene H.R., Kleijer M., Algra J., Roos D., von dem Borne A.E., de Haas M. // *Blood*. 1997. V. 90. № 3. P. 1109–1114.
42. Musolino A., Naldi N., Bortesi B., Pezzuolo D., Capelletti M., Missale G., Laccabue D., Zerbini A., Camisa R., Bisagni G., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2008. V. 26. № 11. P. 1789–1796.
43. Clemenceau B., Congy-Jolivet N., Gallot G., Vivien R., Gaschet J., Thibault G., Vie H. // *Blood*. 2006. V. 107. № 12. P. 4669–4677.
44. 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.
45. 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.
46. Dustin M.L., Shaw A.S. // *Science*. 1999. V. 283. № 5402. P. 649–650.
47. Grakoui A., Bromley S.K., Sumen C., Davis M.M., Shaw A.S., Allen P.M., Dustin M.L. // *Science*. 1999. V. 285. № 5425. P. 221–227.
48. Grakoui A., Bromley S.K., Sumen C., Davis M.M., Shaw A.S., Allen P.M., Dustin M.L. // *J. Immunol.* 2015. V. 194. № 9. P. 4066–4072.
49. Irlles C., Symons A., Michel F., Bakker T.R., van der Merwe P.A., Acuto O. // *Nat. Immunol.* 2003. V. 4. № 2. P. 189–197.
50. Cordoba S.P., Choudhuri K., Zhang H., Bridge M., Basat A.B., Dustin M.L., van der Merwe P.A. // *Blood*. 2013. V. 121. № 21. P. 4295–4302.
51. Moritz D., Groner B. // *Gene Ther.* 1995. V. 2. № 8. P. 539–546.
52. Dotti G., Gottschalk S., Savoldo B., Brenner M.K. // *Immunol. Rev.* 2014. V. 257. № 1. P. 107–126.
53. Hombach A.A., Schildgen V., Heuser C., Finnern R., Gilham D.E., Abken H. // *J. Immunol.* 2007. V. 178. № 7. P. 4650–4657.
54. James S.E., Greenberg P.D., Jensen M.C., Lin Y., Wang J., Till B.G., Raubitschek A.A., Forman S.J., Press O.W. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. № 10. P. 7028–7038.
55. Haso W., Lee D.W., Shah N.N., Stetler-Stevenson M., Yuan C.M., Pastan I.H., Dimitrov D.S., Morgan R.A., FitzGerald D.J., Barrett D.M., et al. // *Blood*. 2013. V. 121. № 7. P. 1165–1174.
56. Guest R.D., Hawkins R.E., Kirillova N., Cheadle E.J., Arnold J., O’Neill A., Irlam J., Chester K.A., Kemshead J.T., Shaw D.M., et al. // *J. Immunother.* 2005. V. 28. № 3. P. 203–211.
57. Long A.H., Haso W.M., Orentas R.J. // *Oncoimmunology*. 2013. V. 2. № 4. P. e23621.
58. Finney H.M., Lawson A.D., Bebbington C.R., Weir A.N. // *J. Immunol.* 1998. V. 161. № 6. P. 2791–2797.
59. Moritz D., Wels W., Mattern J., Groner B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. № 10. P. 4318–4322.
60. Wilkie S., Picco G., Foster J., Davies D.M., Julien S., Cooper L., Arif S., Mather S.J., Taylor-Papadimitriou J., Burchell J.M., et al. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. № 7. P. 4901–4909.
61. Patel S.D., Moskalenko M., Smith D., Maske B., Finer M.H., McArthur J.G. // *Gene Ther.* 1999. V. 6. № 3. P. 412–419.
62. Sadelain M., Brentjens R., Riviere I. // *Curr. Opin. Immunol.* 2009. V. 21. № 2. P. 215–223.
63. Almasbak H., Walseng E., Kristian A., Myhre M.R., Suso E.M., Munthe L.A., Andersen J.T., Wang M.Y., Kvalheim G., Gaudernack G., et al. // *Gene Ther.* 2015. V. 22. № 5. P. 391–403.
64. Hudecek M., Sommermeyer D., Kosasih P.L., Silva-Benedict A., Liu L., Rader C., Jensen M.C., Riddell S.R. // *Cancer Immunol. Res.* 2015. V. 3. № 2. P. 125–135.
65. Jonnalagadda M., Mardiros A., Urak R., Wang X., Hoffman

- L.J., Bernanke A., Chang W.C., Bretzlaff W., Starr R., Priceman S., et al. // *Mol. Ther.* 2015. V. 23. № 4. P. 757–768.
66. Hombach A., Hombach A.A., Abken H. // *Gene Ther.* 2010. V. 17. № 10. P. 1206–1213.
67. Riddell S.R., Protzer U. // *Gene Ther.* 2010. V. 17. № 10. P. 1191–1192.
68. Fitzer-Attas C.J., Schindler D.G., Waks T., Eshhar Z. // *J. Immunol.* 1998. V. 160. № 1. P. 145–154.
69. Bridgeman J.S., Hawkins R.E., Bagley S., Blaylock M., Holland M., Gilham D.E. // *J. Immunol.* 2010. V. 184. № 12. P. 6938–6949.
70. Zhao Y., Wang Q.J., Yang S., Kochenderfer J.N., Zhong Z., Zhong X., Sadelain M., Eshhar Z., Rosenberg S.A., Morgan R.A. // *J. Immunol.* 2009. V. 183. № 9. P. 5563–5574.
71. Shi H., Sun M., Liu L., Wang Z. // *Mol. Cancer.* 2014. V. 13. P. 219.
72. Gosse J.A., Wagenknecht-Wiesner A., Holowka D., Baird B. // *J. Immunol.* 2005. V. 175. № 4. P. 2123–2131.
73. Annenkov A.E., Moyes S.P., Eshhar Z., Mageed R.A., Chernajovsky Y. // *J. Immunol.* 1998. V. 161. № 12. P. 6604–6613.
74. Bridgeman J.S., Ladell K., Sheard V.E., Miners K., Hawkins R.E., Price D.A., Gilham D.E. // *Clin. Exp. Immunol.* 2014. V. 175. № 2. P. 258–267.
75. Irving B.A., Weiss A. // *Cell.* 1991. V. 64. № 5. P. 891–901.
76. Haynes N.M., Snook M.B., Trapani J.A., Cerruti L., Jane S.M., Smyth M.J., Darcy P.K. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. № 1. P. 182–187.
77. Roberts M.R., Cooke K.S., Tran A.C., Smith K.A., Lin W.Y., Wang M., Dull T.J., Farson D., Zsebo K.M., Finer M.H. // *J. Immunol.* 1998. V. 161. № 1. P. 375–384.
78. Lenschow D.J., Walunas T.L., Bluestone J.A. // *Annu. Rev. Immunol.* 1996. V. 14. №. P. 233–258.
79. Gong M.C., Latouche J.B., Krause A., Heston W.D., Bander N.H., Sadelain M. // *Neoplasia.* 1999. V. 1. № 2. P. 123–127.
80. Hombach A., Wiczarkowiec A., Marquardt T., Heuser C., Usai L., Pohl C., Seliger B., Abken H. // *J. Immunol.* 2001. V. 167. № 11. P. 6123–6131.
81. Maher J., Brentjens R.J., Gunset G., Riviere I., Sadelain M. // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. № 1. P. 70–75.
82. Brentjens R.J., Santos E., Nikhamin Y., Yeh R., Matsushita M., La Perle K., Quintas-Cardama A., Larson S.M., Sadelain M. // *Clin. Cancer Res.* 2007. V. 13. № 18. Pt 1. P. 5426–5435.
83. Altwater B., Landmeier S., Pscherer S., Temme J., Juergens H., Pule M., Rossig C. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2009. V. 58. № 12. P. 1991–2001.
84. Wang J., Jensen M., Lin Y., Sui X., Chen E., Lindgren C.G., Till B., Raubitschek A., Forman S.J., Qian X., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2007. V. 18. № 8. P. 712–725.
85. Pule M.A., Straathof K.C., Dotti G., Heslop H.E., Rooney C.M., Brenner M.K. // *Mol. Ther.* 2005. V. 12. № 5. P. 933–941.
86. Song D.G., Ye Q., Poussin M., Harms G.M., Figini M., Powell D.J., Jr. // *Blood.* 2012. V. 119. № 3. P. 696–706.
87. Imai C., Mihara K., Andreansky M., Nicholson I.C., Pui C.H., Geiger T.L., Campana D. // *Leukemia.* 2004. V. 18. № 4. P. 676–684.
88. Finney H.M., Akbar A.N., Lawson A.D. // *J. Immunol.* 2004. V. 172. № 1. P. 104–113.
89. Milone M.C., Fish J.D., Carpenito C., Carroll R.G., Binder G.K., Teachey D., Samanta M., Lakhali M., Gloss B., Danet-Desnoyers G., et al. // *Mol. Ther.* 2009. V. 17. № 8. P. 1453–1464.
90. Zhong X.S., Matsushita M., Plotkin J., Riviere I., Sadelain M. // *Mol. Ther.* 2010. V. 18. № 2. P. 413–420.
91. Carpenito C., Milone M.C., Hassan R., Simonet J.C., Lakhali M., Suhoski M.M., Varela-Rohena A., Haines K.M., Heitjan D.F., Albelda S.M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 9. P. 3360–3365.
92. Karlsson H., Svensson E., Gigg C., Jarvius M., Olsson-Stromberg U., Savoldo B., Dotti G., Loskog A. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 12. P. e0144787.
93. Till B.G., Jensen M.C., Wang J., Qian X., Gopal A.K., Maloney D.G., Lindgren C.G., Lin Y., Pagel J.M., Budde L.E., et al. // *Blood.* 2012. V. 119. № 17. P. 3940–3950.
94. Savoldo B., Ramos C.A., Liu E., Mims M.P., Keating M.J., Carrum G., Kamble R.T., Bollard C.M., Gee A.P., Mei Z., et al. // *J. Clin. Invest.* 2011. V. 121. № 5. P. 1822–1826.
95. 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. 177ra138.
96. 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.
97. 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.
98. 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.* 2015. V. 385. № 9967. P. 517–528.
99. 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., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2014. V. 371. № 16. P. 1507–1517.
100. van der Stegen S.J., Hamieh M., Sadelain M. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2015. V. 14. № 7. P. 499–509.
101. Zhao Z., Condomines M., van der Stegen S.J., Perna F., Kloss C.C., Gunset G., Plotkin J., Sadelain M. // *Cancer Cell.* 2015. V. 28. № 4. P. 415–428.
102. Duong C.P., Westwood J.A., Yong C.S., Murphy A., Devaud C., John L.B., Darcy P.K., Kershaw M.H. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 5. P. e63037.
103. Alonso-Camino V., Sanchez-Martin D., Compte M., Nunez-Prado N., Diaz R.M., Vile R., Alvarez-Vallina L. // *Mol. Ther. Nucl. Acids.* 2013. V. 2. P. e93.