

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение CAR T-лимфоцитов, специфичных к CD19, и оценка их функциональной активности *in vitro*

А.В. Петухов¹, В.А. Маркова², Д.В. Моторин¹,
А.К. Титов¹, Н.С. Белозерова², П.М. Гершович²,
А.В. Карабельский², Р.А. Иванов², Е.К. Зайкова¹,
Е.Ю. Смирнов², П.А. Бутылин¹, А.Ю. Зарицкий¹

¹ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341

²Биотехнологическая компания «Биокад», ул. Связи, д. 34-А, п. Стрельна, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 198515

РЕФЕРАТ

Актуальность. При В-линейных онкогематологических заболеваниях наиболее перспективный вариант адоптивной иммунотерапии предполагает применение клеток с химерным антигенным рецептором (CAR T-лимфоцитов), которые, по данным клинических исследований, продемонстрировали непревзойденные результаты.

Цель. Создание CAR T-лимфоцитов для применения в клинике и исследование их цитотоксичности *in vitro*.

Методы. Т-лимфоциты человека подвергались трансдукции лентивирусным вектором, содержащим гены анти-CD19-CAR, RIAD и GFP. Эффективность трансдукции Т-лимфоцитов оценивалась по уровню сигнала репортерного белка GFP методом проточной цитометрии. Для анализа жизнеспособности клеток применялся пропидий йодид. Цитотоксическая активность полученных CAR Т-лимфоцитов в присутствии клеток-мишеней изучалась при их прямом сокультивировании. Анализ количества CAR Т-клеток, экспрессии цитокинов проводился методом проточной цитометрии.

Результаты. Жизнеспособность трансдуцированных Т-лимфоцитов и экспрессия GFP достигали 91,87 и 50,87 % соответственно. При культивировании в присутствии IL-2 и рекомбинантного CD19 (целевой антиген) количество CAR Т-лимфоцитов увеличивается в 1,4 раза через 120 ч относительно 48 ч. В цитотоксическом тесте при сокультивировании CAR-T с клетками K562-CD19+ доля CAR Т-лимфоцитов увеличивается до 57 и 84,5 % после 48 и 120 ч экспозиции соответственно. В случае культивирования CAR Т-лимфоцитов с клетками K562 (контрольная линия, не экспрессирующая CD19) через 48 ч их число снижалось до 36,2 %, а число K562 возрастало до 58,3 %. Жизнеспособность клеток-мишеней в экспериментальной и контрольной группах составила 3,5 и 36,74 % соответственно. Различия в концентрации IL-6 между контрольной и экспериментальной группами заметно меньше, чем при исследовании других цитокинов (IFN-γ, IL-2, TNF) в этих же группах.

EXPERIMENTAL STUDIES

Manufacturing of CD19 Specific CAR T-Cells and Evaluation of their Functional Activity *in Vitro*

AV Petukhov¹, VA Markova², DV Motorin¹, AK Titov¹,
NS Belozero², PM Gershovich², AV Karabel'skii²,
RA Ivanov², EK Zaikova¹, EYu Smirnov², PA Butylin¹,
AY Zaritsky¹

¹VA Almazov National Medical Research Center, 2 Akkuratova str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341

²Biocad Biotechnology Company, 34-A Svyazi str., Strel'na, Saint Petersburg, Russian Federation, 198515

ABSTRACT

Background. The most promising variant of adoptive immunotherapy of the B-line oncohematological diseases includes the use of cells with the chimeric antigen receptor (CAR T-cells), that showed extraordinary results in clinical studies.

Aim. To manufacture CAR T-cells for the clinical use and to study their cytotoxicity *in vitro*.

Methods. Human T-lymphocytes were transduced by the lentiviral vector containing anti-CD19-CAR, RIAD, and GFP genes. The T-cell transduction efficacy was assessed on the basis of GFP protein signal by flow cytometry. Propidium iodide was used to analyse the cell viability. Cytotoxic activity of the manufactured CAR T-cells was studied in the presence of the target cells being directly co-cultivated. Analysis of the number and viability of CAR T-cells and cytokine expression was performed by flow cytometry.

Results. The viability of the transduced T-cells and GFP expression reached 91.87 % and 50.87 % respectively. When cultured in the presence of IL-2 and recombinant CD19 (the target antigen), the amount of CAR-T after 120 h of the process was 1.4 times larger compared with the period of 48 h. In the cytotoxic test of co-cultivation CAR-T with the K562-CD19+ cells the percentage of CAR-T increased to 57 % and 84.5 % after 48 h and 120 h of exposure respectively. When cultured with the K562 cells (test line not expressing CD19) the number of CAR T-cells decreased to 36.2 % within 48 h while the number of K562 cells increased to 58.3 %. The viability of target cells in the experimental and control groups was 3.5 % and 36.74 % respectively. Comparison of IL-6 level in the control and experimental groups revealed that the differences are insignificant, as opposed to the level of other cytokines (IFN-γ, IL-2, TNF) which proved to be different in both groups.

Conclusion. The present work resulted in the production of anti-CD19 CAR T-cells with adequate viability. The *in vitro* model demonstrated their cytotoxicity. Manufactur-

Заключение. В настоящей работе были получены анти-CD19 CAR Т-лимфоциты с достаточной жизнеспособностью. На модели *in vitro* продемонстрирована их цитотоксичность. Создание CAR Т-лимфоцитов для клинического применения является первым шагом в развитии технологии adoptивной иммунотерапии в Российской Федерации.

Ключевые слова: CAR Т-лимфоциты, иммунотерапия, острый лимфобластный лейкоз, неходжкинские лимфомы, лентивирусная трансдукция, реакция «трансплантат против хозяина», синдром «цитокинового шторма».

Получено: 15 сентября 2017 г.

Принято в печать: 7 декабря 2017 г.

Для переписки: Зарицкий Андрей Юрьевич, д-р мед. наук, профессор, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341; тел.: +7(812)702-68-28, факс: +7(812)702-37-65; e-mail: zaritskey@gmail.com

Для цитирования: Петухов А.В., Маркова В.А., Моторин Д.В. и др. Получение CAR Т-лимфоцитов, специфичных к CD19, и оценка их функциональной активности *in vitro*. Клиническая онкогематология. 2018;11(1):1–9.

DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-1-1-9

ing of CAR T-cells for clinical use is the first step of the development of adoptive immunotherapy in the Russian Federation.

Keywords: CAR T-cells, adoptive immunotherapy, acute lymphoblastic leukemia, non-Hodgkin's lymphomas, lentiviral transduction, graft-versus-host reaction, cytokine release syndrome.

Received: September 15, 2017

Accepted: December 7, 2017

For correspondence: Andrei Yur'evich Zaritskey, MD PhD, 2 Akkuratova str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341; Tel.: +7(812)702-68-28, Fax: +7(812)702-37-65; e-mail: zaritskey@gmail.com

For citation: Petukhov AV, Markova VA, Motorin DV, et al. Manufacturing of CD19 Specific CAR T-Cells and Evaluation of their Functional Activity *in Vitro*. Clinical oncohematology. 2018;11(1):1–9. DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-1-1-9

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в лечении многих гематологических заболеваний были достигнуты существенные успехи. Совершенствуются методы трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, например гаплоидентичной [1], появились новые таргетные препараты [2], существенно расширились возможности молекулярной диагностики ряда заболеваний [3], широкое развитие получила методика инфузии донорских лимфоцитов после аллогенной трансплантации костного мозга. Несмотря на эти достижения, частота рецидивов при гематологических опухолях остается высокой, в то время как эффективность «классической» химиотерапии достигла своих пределов [4]. Именно поэтому наряду с поиском новых молекул для химиотерапевтического воздействия активно разрабатываются альтернативные подходы к лечению опухолевых заболеваний. Наиболее перспективной является иммунотерапия, включающая моноклональные антитела, ингибиторы контрольных точек иммунного ответа, конъюгаты антител с цитотоксическими малыми молекулами, и adoptивная клеточная терапия [5].

Примечательно, что именно в онкогематологии нашел свое реальное применение один из самых передовых иммунотерапевтических методов — adoptивная клеточная терапия генетически модифицированными Т-лимфоцитами. Этот вид лечения совмещает в себе технологии клеточной терапии и генной инженерии [6]. Adoptивная клеточная терапия основана на введении в организм пациента

аутологических или аллогенных Т-лимфоцитов, которые подверглись *ex vivo* генетической модификации и экспрессируют на своей поверхности химерный антигенный рецептор (Chimeric Antigen Receptor, CAR) [7, 8], способный узнавать опухолевые антигены и связываться с ними. При В-клеточных лимфопролиферативных новообразованиях CAR могут быть нацелены на связывание с маркером нормальных и трансформированных В-клеток — поверхностным антигеном CD19 [9]. В клинических исследованиях CD19-CAR-T-терапия показывает высокую эффективность (53–93 % полных ремиссий) при В-клеточных злокачественных лимфопролиферативных заболеваниях: В-ОЛЛ [10–13], неходжкинских лимфомах [14–17], а также хроническом лимфолейкозе [18, 19].

Терапевтические свойства CAR Т-лимфоцита — функциональной единицы adoptивной клеточной терапии — обусловлены экспрессией CAR на ее поверхности. CAR представляет собой рекомбинантную белковую молекулу, которая состоит из нескольких доменов, имеющих различные функции. Внеклеточный домен CAR чаще всего представлен одноцепочечным вариабельным фрагментом антитела, специфичным к опухолевому антигену (single-chain variable fragment, scFv), и обеспечивает независимое от молекул главного комплекса гистосовместимости распознавание мишени (например, CD19, HER2/neu, SLAMF7). Внутриклеточная часть рецептора состоит из ζ-цепи CD3 и дополнительных сигнальных доменов костимуляторных белков, чаще всего CD28 или 4-1BB (CD137). Внутриклеточные домены отвечают за передачу сигнала при связывании с антигеном-мишенью и эффективную активацию CAR Т-лимфоцитов [9, 20, 21].

В настоящее время создано и протестировано несколько вариаций CAR, несущих различные комбинации сигнальных и костимулирующих доменов. В зависимости от количества костимулирующих доменов выделяют несколько поколений и разновидностей CAR-T [22–24]. Так, к 1-му поколению CAR относят рецепторы, не имеющие костимулирующих доменов. Данные CAR не продемонстрировали значимой клинической эффективности в онкогематологии [25]. В исследованиях *in vitro* клетки проходили несколько циклов деления и подвергались апоптозу, а также обладали низкой способностью к секреции цитокинов, в то же время их активность значительно увеличивалась при костимуляции [26].

При дальнейшем изучении сигнального пути классического Т-клеточного рецептора (T-Cell Receptor, TCR) было выявлено, что помимо непосредственного контакта TCR и антигена в составе молекул главного комплекса гистосовместимости ключевую роль в процессе активации Т-клеток играют костимуляторные молекулы, в т. ч. CD28 и CD137 (4-1BB). Это открытие привело к созданию последующих поколений CAR, включающих один костимулирующий домен или более. CAR Т-лимфоциты последующих поколений демонстрировали значительно большую пролиферативную активность *in vivo* и, следовательно, длительную персистенцию в организме человека. В настоящее время CAR 2-го поколения, несущие один костимулирующий домен, имеют наибольшее распространение, хорошо охарактеризованы и демонстрируют высокую эффективность в клинических исследованиях [27, 28].

Несмотря на первые убедительные успехи CD19-CAR-T-терапии при гематологических опухолях, существуют определенные трудности и ограничения. Так, в литературе описаны случаи рецидивов на фоне лечения CD19-CAR-T. Рецидивы при персистенции CAR Т-лимфоцитов в организме были связаны в основном с потерей/изменением структуры поверхностного антигена CD19 на опухолевых клетках [11, 29–32] либо, что наблюдалось реже, со сменой фенотипа бластных клеток с лимфоидного на миелоидный [33, 34]. Высокая специфичность классических фрагментов антител анти-CD19 scFv в составе CAR обуславливает способность опухолевых клеток с deletирующими мутациями в гене, кодирующем CD19, ускользать от CAR Т-лимфоцитов [31]. Одним из возможных решений проблемы рецидивов, а также частичной и полной резистентности, связанных с потерей или мутацией CD19, является использование биспецифичных рецепторов CAR, одновременно к CD19 и другому В-клеточному антигену (например, CD20) [35]. Однако подобные передовые подходы в клинике еще не тестировались. Исходя из этого, оценить их реальный потенциал в лечении гематологических опухолей не представляется возможным. В то же время в одном из исследований I фазы была показана возможность достижения повторных ремиссий у пациентов с CD19-негативным рецидивом. Применение анти-CD22-CAR-T позволило достичь полные ремиссии у 4 из 9 пациентов. У большинства пациентов, включенных в исследование, развились рецидивы после анти-CD19-CAR-T-терапии [36].

Важным фактором, потенциально влияющим на эффективность терапии, является время пер-

систенции CD19-CAR-T-лимфоцитов в организме пациента после инфузии. Именно этот параметр чаще всего используется как суррогатный маркер стойкого ответа на CAR-T-терапию. Результаты исследований продолжительности персистенции CAR Т-лимфоцитов в организме пациентов, проведенных различными группами авторов, существенно различаются. По литературным данным, период, в течение которого в крови пациентов определяются CD19-CAR-T-лимфоциты, варьирует от 1–3 [13, 37] до 24–49 мес. [19]. Полного понимания причин таких значительных различий в сроках персистенции *in vivo* в настоящее время нет, впрочем, как и единого мнения относительно наличия прямой зависимости между временем жизни CAR Т-лимфоцитов в организме пациента и эффективностью терапии. По некоторым данным, анти-CD19-CAR-T-лимфоциты с рецептором, в составе которого используется костимулирующий домен 4-1BB, менее подвержены истощению, обусловленному продолжительной персистенцией, по сравнению с клетками с рецептором, содержащим домен CD28 [38]. В то же время обобщенные результаты клинических исследований не позволяют четко определить роль костимулирующего домена 4-1BB в увеличении срока жизни CAR Т-лимфоцитов в организме. В некоторых случаях элиминация CAR Т-лимфоцитов была связана с иммунным ответом организма в совокупности с неоптимальным режимом лимфодеплеции. К тому же описаны эпизоды, когда у пациентов наблюдался стойкий ответ при отсутствии определяемых в крови CAR Т-лимфоцитов [11]. Таким образом, оптимальная продолжительность персистенции, обеспечивающая максимальную эффективность, до сих пор не установлена [28, 39]. Вполне возможно, что уровень реактивности CAR Т-лимфоцитов и, как следствие, степень быстрого ответа пациента на терапию могут быть не менее критичными, чем продолжительность персистенции CAR Т-лимфоцитов в организме.

Цель данного исследования заключается в получении жизнеспособной популяции анти-CD19-CAR-T-лимфоцитов в лабораторных условиях и оценке их функциональной активности *in vitro*. Помимо CD19-CAR в состав генетической конструкции была внедрена последовательность, кодирующая короткий пептид RIAD — ингибитор взаимодействия протеинкиназы А и белка эрзина [40]. Показано, что подобная модификация CAR Т-лимфоцитов, специфичных к мезотелину (маркеру некоторых солидных опухолей), приводит к существенному усилению их противоопухолевой активности [41]. Мы изучили эффективность лентивирусной трансдукции Т-лимфоцитов, а также оценили их пролиферативную и цитотоксическую активность при совместном культивировании с CD19-позитивными и CD19-негативными клеточными линиями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры клеток

Культивируемые Т-лимфоциты человека (Т-ЛФ) были получены из моноклеарной фракции периферической крови здорового донора (после подписания информированного согласия) путем центрифуги-

рования в градиенте плотности с использованием Ficoll-Paque плотностью 1,078 г/мл (GE Healthcare, США). Для селекции и активации Т-ЛФ были применены частицы DynabeadsHumanT-activatorCD3/CD28 (Invitrogen, США) в концентрации 2 частицы на 1 клетку. Субпопуляция Т-ЛФ культивировалась на среде RPMI 1640 (Thermofisher, США) с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Hyclone, США), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 300 ЕД/мл рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 (IL-2) («Биотех», Россия).

Клетки линии K562 культивировались на среде RPMI 1640 (Thermofisher, США) с добавлением 5 % FBS (Hyclone, США), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина.

Для культивации клеток линии HEK-293T применялась среда OptiMEM (Thermofisher, США) с добавлением 5 % FBS (Hyclone, США), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина.

Создание генетических конструкций для наработки рекомбинантных лентивирусных векторов

Для создания конструкции CD19-CAR-T-RIAD был использован лентивирусный вектор lentiCRISPRv2 (Addgene plasmid #52961), предоставленный д-ром Feng Zhang [42]. FMC63-28ZCAR [43] был синтезирован компанией «АТГ Сервис Ген» (Санкт-Петербург). Кассета CD19-CAR-T2A-GFP-RIAD состояла из гена анти-CD19-CAR, пептида T2A, обеспечивавшего бицистронную трансляцию, репортерного белка GFP, обеспечивающего оценку эффективности трансдукции, и пептида RIAD, усиливающего активационный сигнал. Клонирование кассеты осуществлялось по сайтам рестрикции AgeI и MluI.

Кроме того, на основе лентивирусного вектора lentiCRISPRv2 была создана плазмида, несущая ген человеческого CD19 (амплифицированного из кДНК клеточной линии CLL-HG3), которая использовалась для наработки рекомбинантных лентивирусных векторов и создания с их помощью клеточной линии K562-CD19+, характеризующейся выраженной экспрессией CD19. В дальнейшем клетки этой инженерной линии были задействованы в качестве мишеней для проверки функциональной активности CAR Т-лимфоцитов.

Транзиентная наработка лентивирусных векторов

Для создания лентивирусных векторов, содержащих ген CAR-CD19 (для трансдукции Т-лимфоцитов) или ген CD19 (для трансдукции клеток K562), клетки линии HEK-293T были трансфицированы указанными выше генетическими конструкциями на основе лентивирусного вектора lentiCRISPRv2 совместно с пакующей плазмидой PsPax2 (Addgene plasmid #12260). Кроме того, использовался вектор, кодирующий белки оболочки вируса рMD2.G (Addgene plasmid #12259) и 25-кДа линейный полиэтиленамин (Sigma-Aldrich, США). PsPax2 и рMD2.G любезно предоставлены д-ром Didier Trono. После 12 ч инкубации среда заменялась на DMEM с глутамином (Thermofisher, США) с добавлением 5 % FBS (Hyclone, США) и 1 ммоль бутирата натрия, инкубация продолжалась еще 48 ч. Супернатант,

содержащий вирусные частицы, был собран, профильтрован через стерильный мембранный фильтр из полиэфирсульфона с диаметром пор 0,45 мкм (Millipore, США) и концентрирован с помощью центрифужного модуля Амикон Ультра-15, 100 кДа (Millipore, США) со скоростью 3000 g в течение получаса.

Создание CD19-CAR-T-RIAD-лимфоцитов методом вирусной трансдукции

Через 48 ч после активации культура Т-лимфоцитов подвергалась вирусной трансдукции в условиях множественного заражения (10 MOI) с применением 50 мкг/мл раствора протамина сульфата (Sigma-Aldrich, США). После трансдукции клетки продолжали инкубировать на среде RPMI 1640 (Thermofisher, США) в течение 72 ч. Аналогичным способом была получена культура K562-CD19+. Эффективность трансдукции Т-лимфоцитов лентивирусным препаратом оценивалась по уровню определения сигнала репортерного белка GFP методом проточной цитометрии. Одновременно проводился анализ жизнеспособности клеток в популяции с использованием флуоресцентного красителя пропидия йодида (Thermofisher, США). Экспрессия CD19 на клетках линии K562-CD19+ оценивалась с использованием проточного цитометра и специфичных к CD19 антител (BD Biosciences, США).

Оценка функциональной активности CAR Т-лимфоцитов *in vitro*

Влияние связывания CAR с антигеном на пролиферативную активность CAR Т-лимфоцитов было изучено при добавлении рекомбинантного белка CD19 (Thermofisher, США) в концентрации 2 мкг/мл в среду культивирования. В качестве стандарта при подсчете клеток в популяции методом проточной цитометрии в экспериментальные образцы добавлялись референсные частицы CountBrightAbsoluteCountingBeads (Thermofisher, США) из расчета 10 мкл на 250 мкл клеточной суспензии.

Цитотоксическая активность CAR Т-лимфоцитов в присутствии клеток-мишеней (K562-CD19+, K562) изучалась при их прямом сокультивировании в равном соотношении (1:1). Перед началом эксперимента клетки-мишени подвергались обработке митомицином в концентрации 0,2 мкг/мл в течение 60 мин (Sigma, США) для остановки пролиферации с последующим 3-кратным отмыванием средой культивирования.

Анализ количества CAR Т-лимфоцитов в смешанной популяции проводился методом проточной цитометрии при окрашивании антителами Brilliantviolet 421 anti-human CD3 Antibody (Biolegend, США).

Проточная цитометрия

Все измерения выполнялись с использованием проточного цитометра GuavaeasyCyte™ 12HT (Merck Millipore, США) и программного обеспечения GuavaSoft 3.1.1. Для анализа экспериментальные образцы предварительно отмывались от среды культивирования. Окраска клеток антителами и флуоресцентными красителями выполнялась согласно инструкции производителя.

Для анализа концентрации растворимых форм цитокинов в образцах среды культивирования ис-

пользовался набор BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit (BD, США) через 48 и 120 ч от времени начала эксперимента. Анализ проводился согласно инструкции производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эффективность продукции CAR T-лимфоцитов *ex vivo*

Оценка эффективности продукции CAR T-лимфоцитов проводилась спустя 72 ч после трансдукции Т-лимфоцитов лентивирусным препаратом *ex vivo*. Было показано, что количество жизнеспособных Т-лимфоцитов в популяции оставалось высоким и составляло 91,87 %. При этом эффективность вирусной трансдукции, которая оценивалась по количеству жизнеспособных Т-лимфоцитов, экспрессирующих репортерный белок GFP, составляла 51,06 % (рис. 1). Следует отметить, что метод привнесения CAR в Т-лимфоциты с помощью лентивирусной трансдукции является эффективным и не оказывает существенного влияния на жизнеспособность культуры клеток.

Пролиферативная активность CAR Т-лимфоцитов в присутствии рекомбинантного целевого антигена CD19

С целью оценить способность CAR Т-лимфоцитов к активации в ответ на связывание с целевым антигеном CD19 в культуральную среду был добавлен рекомбинантный белок rCD19 в концентрации 2 мкг/мл. Контролем в данном эксперименте служили CAR Т-клетки, культивированные без добавления специфического активатора.

Результаты свидетельствуют о том, что в среде без добавления rCD19 через 120 ч наблюдалось снижение общего числа клеток в популяции в 1,5 раза относительно временной точки 48 ч (рис. 2). В то же время

их жизнеспособность на протяжении 120 ч культивирования изменяется незначительно и остается на уровне более 92,18 %. Доля клеток, экспрессирующих репортерный белок GFP, практически не снижается (табл. 1).

При добавлении в среду культивирования rCD19 (2 мкг/мл) общее количество клеток через 120 ч куль-

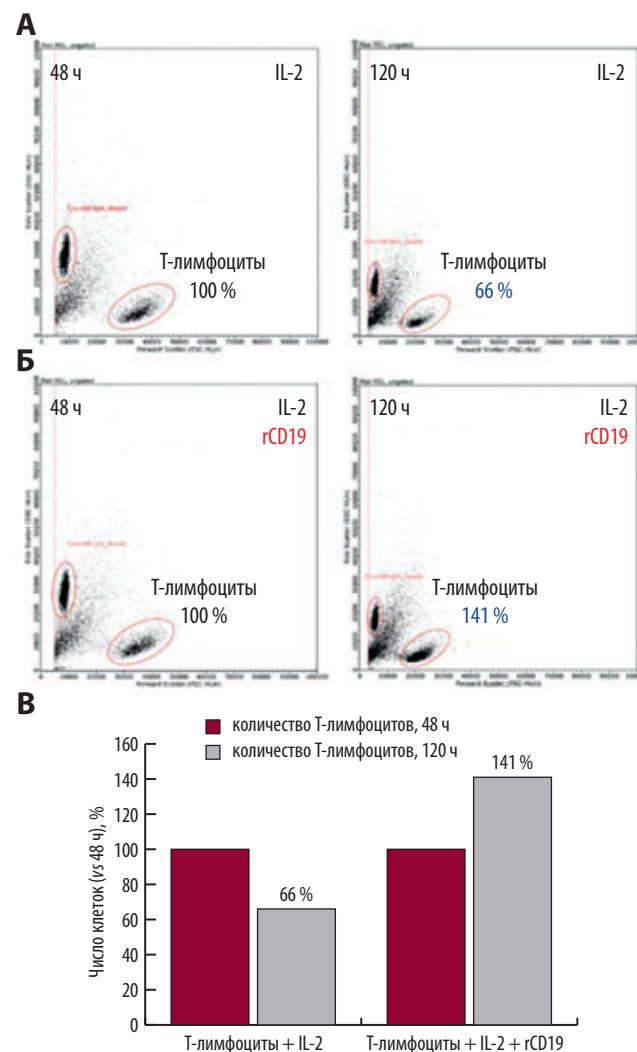


Рис. 2. Оценка пролиферативной активности анти-CD19-CAR-RIAD-GFP Т-лимфоцитов в присутствии человеческого рекомбинантного CD19

А — график распределения: Т-лимфоциты, культивируемые в присутствии IL-2 (100 ЕД); Б — график распределения: Т-лимфоциты, культивируемые в присутствии IL-2 (100 ЕД) и rCD19 (2 мкг/мл); В — динамика изменения количества Т-лимфоцитов после 120 ч культивирования

Fig. 2. Assessment of the proliferative activity of anti-CD19-CAR-RIAD-GFP T-cells in the presence of human recombinant CD19

А — dot plot: T-cells cultured in the presence of IL-2 (100 U); Б — dot plot: T-cells, cultured in the presence of IL-2 (100 U) and rCD19 (2 μ g/ml); В — dynamics of T-cells count after 12 h of cultivation

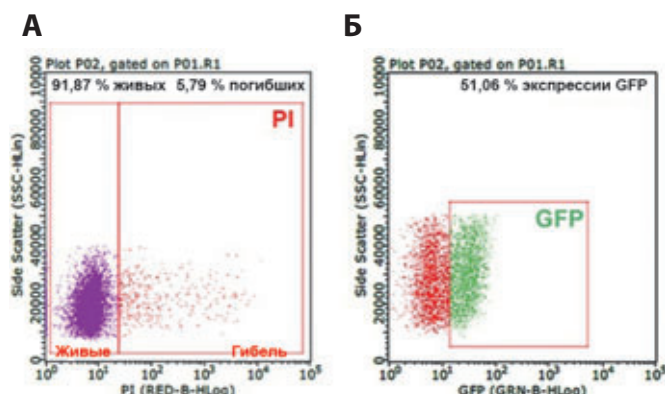


Рис. 1. Жизнеспособность и оценка эффективности трансдукции Т-лимфоцитов лентивирусным препаратом анти-CD19-CAR-RIAD-GFP

А — график распределения: жизнеспособность Т-лимфоцитов (окраска пропидия йодидом — PI); Б — график распределения: уровень экспрессии GFP в Т-лимфоцитах

Fig. 1. Viability of T-cells and estimation of transduction efficacy by the lentiviral vector containing anti-CD19-CAR-RIAD-GFP

А — dot plot: viability of T-cells (PI stain); Б — dot plot: GFP expression level in T-cells

Таблица 1. Оценка жизнеспособности и уровня экспрессии репортерного белка GFP при культивировании CAR Т-лимфоцитов в присутствии rCD19 (2 мкг/мл) по сравнению с контролем

Исследуемая группа	48 ч		120 ч	
	Живые, %	GFP	Живые, %	GFP
Т-лимфоциты + IL-2 (100 ЕД)	96,85	52,17	92,18	49,71
Т-лимфоциты + IL-2 (100 ЕД) + rCD19 (2 мкг/мл)	96,79	51,68	93,83	49,44

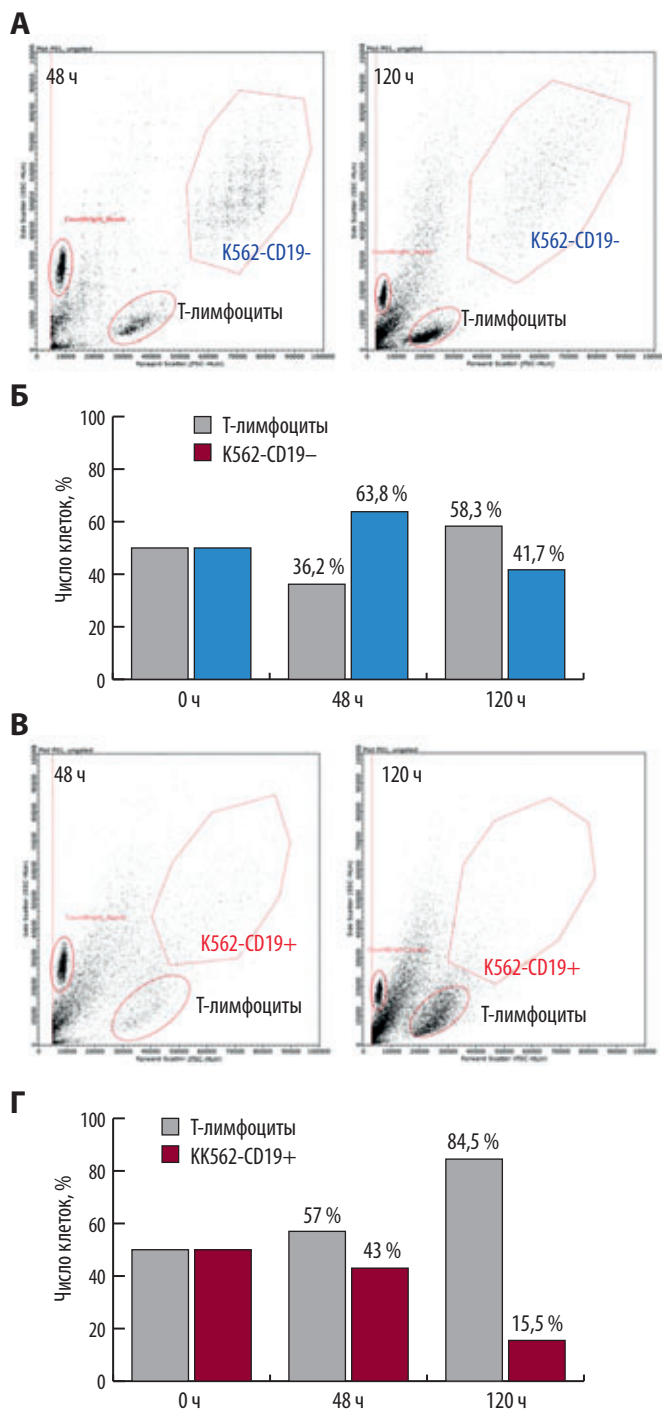


Рис. 3. Оценка цитотоксической активности Т-лимфоцитов после трансдукции лентивирусным препаратом анти-CD19-CAR-RIAD-GFP при сокультивировании с клетками-мишенями K562-CD19- и K562-CD19+

А — график распределения: Т-лимфоциты и клетки K562-CD19 (1:1) при сокультивировании 48 и 120 ч; Б — динамика изменения процентного соотношения Т-лимфоцитов и клеток K562 при сокультивировании 48 и 120 ч; В — график распределения: Т-лимфоциты и K562-CD19+ (1:1) при сокультивировании 48 и 120 ч; Г — динамика изменения процентного соотношения Т-лимфоцитов и клеток K562-CD19+ при сокультивировании 48 и 120 ч

Fig. 3. Cytotoxic activity of human T-cells after transduction with anti-CD19-CAR-RIAD-GFP when co-cultured with K562-CD19- and K562-CD19+ target cells:

А — dot plot: T-cells and K562-CD19 cells (1:1), 48 h and 120 h of co-cultivation; Б — percentage dynamics of T-cells and K562 cells, 48 h and 120 h of co-cultivation; В — dot plot: T-cells and K562-CD19+ cells (1:1), 48 h and 120 h of co-cultivation; Г — percentage dynamics of T-cells and K562-CD19+ cells, 48 h and 120 h of co-cultivation

тивирования увеличивается в 1,4 раза относительно их количества спустя 48 ч культивирования (см. рис. 2). Жизнеспособность клеток при этом также снижается незначительно и через 120 ч культивирования составляет более 93,83 %. Количество клеток, экспрессирующих репортерный белок GFP, практически не изменяется по отношению к контрольной группе, описанной выше (см. табл. 1).

Оценка функциональной активности CAR Т-лимфоцитов *in vitro*

Для изучения функциональной активности CAR Т-лимфоцитов использовался метод прямого сокультивирования эффекторных клеток и клеток-мишеней, экспрессирующих на своей поверхности целевой антиген CD19. Культура CAR Т-лимфоцитов была смешана с клетками-мишенями линий K562-CD19+ или K562 (не экспрессирующих CD19) в соотношении 1:1.

Совместное культивирование CAR Т-лимфоцитов с клетками K562 в течение 48 ч приводило к снижению числа CAR Т-лимфоцитов до 36,2 % и повышению числа K562 до 58,3 %. Через 120 ч соотношение составляло 58,3 (Т-клетки) и 41,7 % (K562) (рис. 3, А, Б). В то же время совместное культивирование CAR Т-лимфоцитов с клетками K562-CD19+ (выраженная экспрессия CD19) приводило к более значительному увеличению количества CAR Т-лимфоцитов в популяции до 57 и 84,5 % после 48 и 120 ч экспозиции соответственно. Элиминация клеток-мишеней линии K562-CD19+ происходила более активно, их количество уменьшалось до 43 и 15,5 % соответственно (рис. 3, В, Г).

Число жизнеспособных клеток-мишеней K562 и K562-CD19+ снижалось в течение всего периода сокультивирования с CAR Т-лимфоцитами. Количество живых клеток в контрольной (K562) и экспериментальной (K562-CD19+) группах составило 56,9 и 9,32 % после 48 ч сокультивирования, 36,74 и 3,5 % после 120 ч соответственно. Необходимо отметить, что клетки-мишени, экспрессирующие CD19, демонстрировали значительно меньшую жизнеспособность после 48 и 120 ч сокультивирования (табл. 2).

Количество жизнеспособных CAR Т-лимфоцитов в популяции при сокультивировании с клетками-мишенями изменялось незначительно. Спустя 48 ч после начала сокультивирования доля живых клеток была 93,56 (в присутствии K562) и 82,76 % (в присутствии K562-CD19+), после 120 ч — 86,41 и 78,98 % соответственно (см. табл. 2). Примечательно, что при сокультивировании с клетками K562-CD19- наблюда-

Таблица 2. Оценка активности и уровня экспрессии репортерного белка GFP в CAR Т-лимфоцитах при сокультивировании с клетками K562

Исследуемая группа	48 ч			120 ч		
	CAR-T		K562	CAR-T		K562
	Живые, %	GFP, %	Живые, %	Живые, %	GFP, %	Живые, %
CAR-T + K562	93,56	51,81	56,9	86,41	43,76	36,74
CAR-T + K562-CD19+	82,76	22,3	9,32	78,98	45,79	3,5

лось снижение числа GFP-позитивных Т-лимфоцитов с 50,22 (после 48 ч) до 43,67 % (после 120 ч). При этом в присутствии клеток K562-CD19+ после 48 ч сокультивирования количество GFP-позитивных Т-лимфоцитов составляло 22,3 %, однако спустя 120 ч их количество увеличилось до 45,79 % (см. табл. 2).

Таким образом, полученные результаты указывают на наличие выраженной целевой цитотоксической активности CAR Т-лимфоцитов в отношении мишеней, несущих на своей поверхности целевой антиген CD19, а также их способности к антигензависимой активации и дальнейшей пролиферации.

Продукция цитокинов

При анализе образцов среды культивирования, полученных в различный срок сокультивирования CAR Т-лимфоцитов с клетками-мишенями линий K562-CD19 и K562, было выявлено значительное увеличение уровня IL-2, фактора некроза опухолей (TNF) и интерферона- γ (IFN- γ) в присутствии K562-CD19+. Концентрация IL-2 через 48 ч после начала сокультивирования составляла 962 пг/мл, а в присутствии K562 — 68 пг/мл. Через 120 ч после начала сокультивирования уровень IL-2 был 854 и 31 пг/мл соответственно. Концентрация TNF через 48 ч в присутствии K562-CD19+ составляла 139,46 пг/мл, а через 120 ч определялась на уровне 62,85 пг/мл. При этом TNF в присутствии K562 практически не секретировался. Концентрация IFN- γ через 48 ч после начала сокультивирования составляла 528,04 пг/мл, а через 120 ч увеличивалась до

1307,45 пг/мл. В присутствии K562 уровень IFN- γ не превышал 3 пг/мл (рис. 4). В то же время уровни IL-4, IL-6 и IL-10 при сокультивировании с клетками-мишенями линий K562-CD19+ и K562 не изменялись (см. рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

CD19 является перспективной мишенью для антигенспецифической иммунотерапии, поскольку он экспрессируется на поверхности большинства опухолевых В-клеток [44], в то время как в нормальных тканях экспрессия этого маркера ограничена В-клетками и, предположительно, фолликулярными дендритными клетками [45]. Использование антигенсвязывающего домена анти-CD19 в составе CAR для адоптивной иммунотерапии позволило получить многообещающие результаты при рецидивах и рефрактерных В-клеточных неоплазиях [46].

Полученные нами в лабораторных условиях CD19-CAR-Т-лимфоциты являются потенциально клинически применимыми (эффективность генетической модификации Т-лимфоцитов 50,87 %, жизнеспособность более 90 %). Методы культивирования клеток и последующей лентивирусной трансдукции, которые были использованы в данной работе, могут быть адаптированы к международному стандарту GMP.

При исследовании функциональных свойств полученная нами популяция генетически модифици-

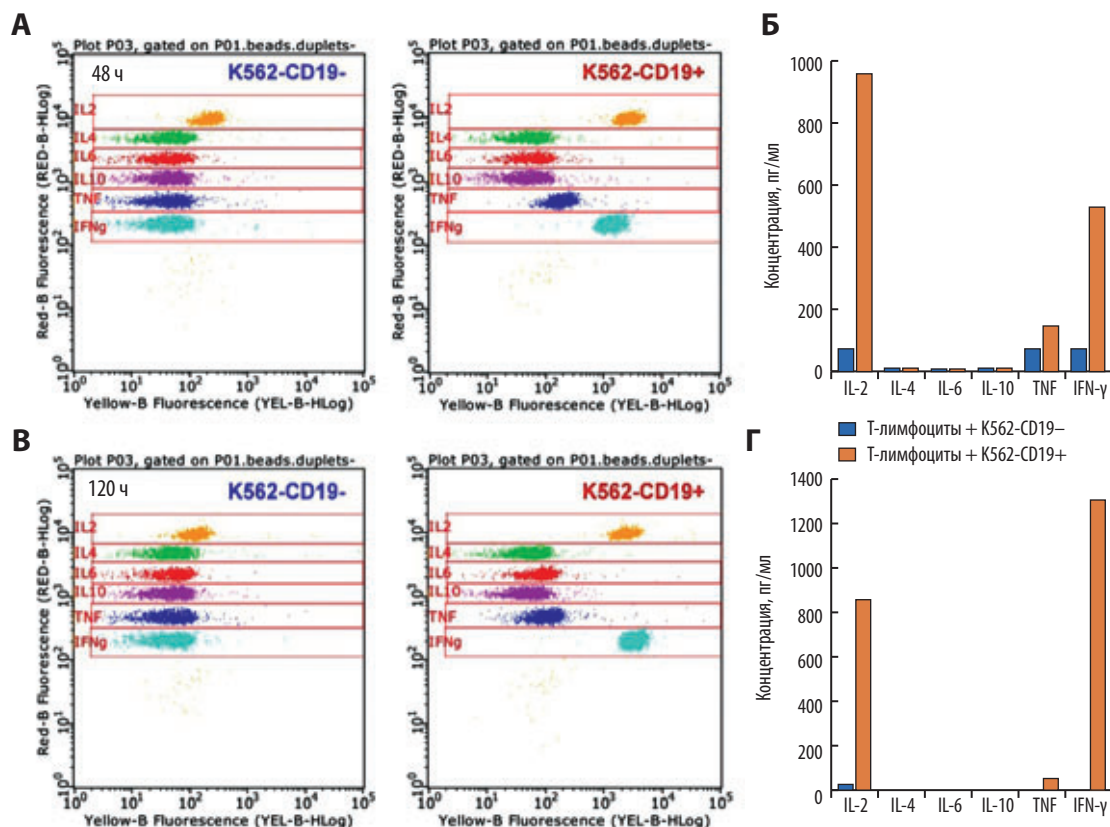


Рис. 4. Уровень экспрессии цитокинов при сокультивировании CAR Т-лимфоцитов с клетками-мишенями линий K562-CD19+ и K562-CD19-. Оценка методом проточной цитометрии

А, Б — сокультивирование в течение 48 ч; В, Г — сокультивирование в течение 120 ч

Fig. 4. Cytokine expression in co-cultivation CAR T-cells with K562-CD19+ and K562-CD19- target cells evaluated by flow cytometry

А, Б — co-cultivation for 48 h; В, Г — co-cultivation for 120 h

рованных Т-лимфоцитов характеризовалась пролиферативной активностью в присутствии клеток-мишеней, экспрессирующих CD19. При этом экспериментальные CAR Т-лимфоциты обладали выраженной специфичной цитотоксической активностью *in vitro*. При прямом сокультивировании CAR Т-лимфоциты эффективно элиминировали клетки, несущие на своей поверхности специфический антиген. Параллельно с этим отмечалось существенное повышение концентрации IL-2, TNF и IFN- γ . Известно, что высокий уровень IL-6 отмечается у пациентов на фоне терапии CAR-T, особенно при развитии синдрома «цитокинового шторма». В то же время полученные нами CAR Т-лимфоциты не продуцировали IL-6. Это подтверждается и в других экспериментальных работах, в которых показано, что IL-6 выявляется только при сокультивировании CAR Т-лимфоцитов с антигенпрезентирующими клетками моноцитарного ряда [47, 48]. Необходимо отметить, что в наших экспериментах добавление в среду культивирования rCD19 также приводило к повышению пролиферативной активности популяции Т-лимфоцитов, что свидетельствует об активации CAR-T в присутствии растворимого целевого антигена. Таким образом, анализ *in vitro* показал избирательность цитотоксического эффекта CAR Т-лимфоцитов, их способность к продукции цитокинов и выраженную пролиферативную активность как при сокультивировании с клетками-мишенями, так и при присутствии в среде культивирования целевого антигена.

Несмотря на впечатляющие результаты CAR-T-терапии, полученные в клинических исследованиях [46, 49], крайне высокая стоимость [50] производства CAR Т-лимфоцитов является серьезным препятствием на пути ее широкого применения в клинической практике. Именно поэтому актуальность разработки технологии для получения универсальных аллогенных CAR-T (позволяющей существенно снизить стоимость терапии) чрезвычайно высока. Чтобы создать универсальные CAR Т-лимфоциты для уменьшения возможных побочных эффектов, представляется целесообразной дальнейшая модификация клеток — уменьшение экспрессии нативного TCR молекул главного комплекса гистосовместимости I класса. Кроме того, возможно включение в геном CAR Т-лимфоцитов так называемых суицидальных генов, позволяющих при необходимости осуществить быструю элиминацию клеток путем применения определенных препаратов, например ганцикловира [21, 51, 52].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами на модели *in vitro* убедительные данные о работоспособности анти-CD19-CAR-T демонстрируют возможность успешного применения генетически модифицированных Т-лимфоцитов в качестве биомедицинского клеточного продукта для лечения в онкогематологии. Очевидно, что использование CAR Т-лимфоцитов в клинике требует детального понимания особенностей их применения *in vivo*, оптимизации схемы их введения и контроля аспектов безопасности. В связи с этим требуется дальнейшая

оценка эффективности данной клеточной терапии у животных. Последующие исследования в области CAR Т-лимфоцитов будут направлены на универсализацию и снижение себестоимости продукта.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: А.В. Петухов, А.К. Титов, Д.В. Моторин.

Сбор и обработка данных: А.К. Титов, Д.В. Моторин, В.А. Маркова.

Предоставление материалов исследования: А.В. Петухов, Е.Ю. Смирнов, Е.К. Зайкова, П.А. Бутылин.

Анализ и интерпретация данных: А.К. Титов, Д.В. Моторин.

Подготовка рукописи: А.В. Петухов, А.К. Титов, Д.В. Моторин.

Окончательное одобрение рукописи: П.М. Гершович, А.В. Карабельский, Р.А. Иванов, Н.С. Белозерова, А.Ю. Зарицкий.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kanakry CG, Fuchs EJ, Luznik L. Modern approaches to HLA-haploidentical blood or marrow transplantation. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;13(1):10–24. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.128.
2. Podhorecka M, Markowicz J, Szymczyk A, Pawlowski J. Target therapy in hematological malignances: new monoclonal antibodies. *Int Sch Res Not*. 2014;2014(3):1–16. doi: 10.1155/2014/701493.
3. Hussaini M. Biomarkers in Hematological Malignancies: A Review of Molecular Testing in Hematopathology. *Cancer Control*. 2015;22(2):158–66. doi: 10.1177/107327481502200206.
4. Forman SJ, Rowe JM. The myth of the second remission of acute leukemia in the adult. *Blood*. 2013;121(7):1077–82. doi: 10.1182/blood-2012-08-234492.
5. Im A, Pavletic SZ. Immunotherapy in hematologic malignancies: past, present, and future. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):94. doi: 10.1186/s13045-017-0453-8.
6. Lusk MR, DeAngelo DJ. Chimeric Antigen Receptor Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia Clinical Practice. *Curr Hematol Malig Rep*. 2017;12(4):370–9. doi: 10.1007/s11899-017-0394-x.
7. Fesnak A, June CH, Levine BL. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(9):566–81. doi: 10.1038/nrc.2016.97.
8. Lim W, June C. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell*. 2017;168(4):724–40. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.016.
9. Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov*. 2013;3(4):388–98. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0548.
10. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al. CD19-Targeted T Cells Rapidly Induce Molecular Remissions in Adults with Chemotherapy-Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci Transl Med*. 2013;5(177):177ra38. doi: 10.1126/scitranslmed.3005930.
11. Maude SL, Frey N, Shaw P, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N Engl J Med*. 2014;371(16):1507–17. doi: 10.1056/NEJMoa1407222.
12. Turtle CJ, Hanafi L-A, Berger C, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest*. 2016;126(6):2123–38. doi: 10.1172/JCI85309.
13. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children

and young adults: A phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2015;385(9967):517–28. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3.

14. Onea AS, Jazirehi AR. CD19 chimeric antigen receptor (CD19 CAR)-redirected adoptive T-cell immunotherapy for the treatment of relapsed or refractory B-cell Non-Hodgkin's Lymphomas. *Am J Cancer Res*. 2016;6(2):403–24.

15. Kebriaei P, Singh H, Huls MH, et al. Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells. *J Clin Invest*. 2016;126(9):3363–76. doi: 10.1172/JCI86721.

16. ICML 2017: Data From the TRANSCEND Trial of JCART17 in Relapsed and Refractory Aggressive B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma — The ASCO Post. Available from: <http://www.ascopost.com/News/57764> (accessed 7.10.2017).

17. Locke FL, Neelapu SS, Bartlett NL, et al. Abstract CT019: Primary results from ZUMA-1: a pivotal trial of axicabtagene ciloleucel (axicel; KTE-C19) in patients with refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma (NHL). *Cancer Res*. 2017;77(13 Suppl):CT019. doi: 10.1158/1538-7445.AM2017-CT019.

18. Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al. T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia. *Sci Transl Med*. 2011;3(95):95ra73. doi: 10.1126/scitranslmed.3002842.

19. Porter DL, Hwang W-T, Frey NV, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med*. 2015;7(303):303ra139. doi: 10.1126/scitranslmed.aac5415.

20. Jensen MC, Riddell SR. Designing chimeric antigen receptors to effectively and safely target tumors. *Curr Opin Immunol*. 2015;33:9–15. doi: 10.1016/j.coi.2015.01.002.

21. Павлова А.А., Масчан М.А., Пономарев В.Б. Адоптивная иммунотерапия генетически модифицированными Т-лимфоцитами, экспрессирующими химерные антигенные рецепторы. *Онкогематология*. 2017;12(1):17–32. doi: 10.17650/1818-8346-2017-12-1-17-32.

[Pavlova AA, Maschan MA, Ponomarev VB. Adoptive immunotherapy with genetically engineered T lymphocytes modified to express chimeric antigen receptors. *Oncohematology*. 2017;12(1):17–32. doi: 10.17650/1818-8346-2017-12-1-17-32. (In Russ)]

22. Dai H, Wang Y, Lu X, Han W. Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2016;108(7):1–15. doi: 10.1093/jnci/djv439.

23. Abate-Daga D, Davila ML. CAR models: next-generation CAR modifications for enhanced T-cell function. *Mol Ther Oncolytics*. 2016;3:16014. doi: 10.1038/mto.2016.14.

24. Holzinger A, Barden M, Abken H. The growing world of CAR T cell trials: a systematic review. *Cancer Immunol Immunother*. 2016;65(12):1433–50. doi: 10.1007/s00262-016-1895-5.

25. Jensen MC, Popplewell L, Cooper LJ, et al. Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(9):1245–56. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.03.014.

26. Gong MC, Latouche JB, Krause A, et al. Cancer patient T cells genetically targeted to prostate-specific membrane antigen specifically lyse prostate cancer cells and release cytokines in response to prostate-specific membrane antigen. *Neoplasia*. 1999;1(2):123–7.

27. Davila ML, Sadelain M. Biology and clinical application of CAR T cells for B cell malignancies. *Int J Hematol*. 2016;104(1):6–17. doi: 10.1007/s12185-016-2039-6.

28. Park JH, Geyer MB, Brentjens RJ. CD19-targeted CAR T-cell therapeutics for hematologic malignancies: interpreting clinical outcomes to date. *Blood*. 2016;127(26):3312–20. doi: 10.1182/blood-2016-02-629063.

29. Grupp S, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(16):1509–18. doi: 10.1056/NEJMoa1215134.

30. Yu H, Sotillo E, Harrington C, et al. Repeated loss of target surface antigen after immunotherapy in primary mediastinal large B cell lymphoma. *Am J Hematol*. 2017;92(1):E11–E13. doi: 10.1002/ajh.24594.

31. Sotillo E, Barrett DM, Black KL, et al. Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discov*. 2015;5(12):1282–95. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-1020.

32. Fischer J, Paret C, El Malki K, et al. CD19 Isoforms Enabling Resistance to CART-19 Immunotherapy Are Expressed in B-ALL Patients at Initial Diagnosis. *J Immunother*. 2017;40(5):187–95. doi: 10.1097/CJI.0000000000000169.

33. Jacoby E, Nguyen SM, Fountaine TJ, et al. CD19 CAR immune pressure induces B-precursor acute lymphoblastic leukaemia lineage switch exposing inherent leukaemic plasticity. *Nat Commun*. 2016;7:12320. doi: 10.1038/ncomms12320.

34. Gardner R, Wu D, Cherian S, et al. Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood*. 2016;127(20):2406–10. doi: 10.1182/blood-2015-08-665547.

35. Zah E, Lin M-Y, Silva-Benedict A, et al. T Cells Expressing CD19/CD20 B-specific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. *Cancer Immunol Res*. 2016;4(6):498–508. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0231.

36. Shah NN, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, et al. Minimal Residual Disease Negative Complete Remissions Following Anti-CD22 Chimeric Antigen Receptor (CAR) in Children and Young Adults with Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *Blood*. 2016;128(22):650.

37. Davila ML, Riviere I, Wang X, et al. Efficacy and Toxicity Management of 19-28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci Transl Med*. 2014;6(224):224ra25. doi: 10.1126/scitranslmed.3008226.

38. Long AH, Haso WM, Shern JF, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med*. 2015;21(6):581–90. doi: 10.1038/nm.3838.

39. Hay KA, Turtle CJ. Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells: Lessons Learned from Targeting of CD19 in B-Cell Malignancies. *Drugs*. 2017;77(3):237–45. doi: 10.1007/s40265-017-0690-8.

40. Wehbi VL, Tasken K. Molecular mechanisms for cAMP-mediated immunoregulation in T cells – role of anchored protein kinase a signaling units. *Front Immunol*. 2016;7:1–19. doi: 10.3389/fimmu.2016.00222.

41. Newick K, O'Brien S, Sun J, et al. Augmentation of CAR T-cell Trafficking and Antitumor Efficacy by Blocking Protein Kinase A Localization. *Cancer Immunol Res*. 2016;4(6):541–51. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0263.

42. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods*. 2014;11(8):783–4. doi: 10.1038/nmeth.3047.

43. Kochenderfer JN, Feldman SA, Zhao Y, et al. Construction and Pre-clinical Evaluation of an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor. *J Immunother*. 2009;32(7):689–702. doi: 10.1097/CJI.0b013e3181ac6138.

44. Wang K, Wei G, Liu D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol*. 2012;1(1):36. doi: 10.1186/2162-3619-1-36.

45. Uckun FFM, Jaszcz W, Ambrus JJJ, et al. Detailed Studies on Expression and Function of CD19 Surface Determinant by Using B43 Monoclonal Antibody and the Clinical Potential of Anti-CD19 Immunotoxins. *Blood*. 1988;71(1):13–29.

46. Wei G, Ding L, Wang J, et al. Advances of CD19-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in refractory/relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol Oncol*. 2017;6(1):10. doi: 10.1186/s40164-017-0070-9.

47. Barrett DM, Singh N, Hofmann TJ, et al. Interleukin 6 Is Not Made By Chimeric Antigen Receptor T Cells and Does Not Impact Their Function. *Blood*. 2016;128(22):2016–7.

48. Singh N, Hofmann TJ, Gershenson Z, et al. Monocyte lineage-derived IL-6 does not affect chimeric antigen receptor T-cell function. *Cytotherapy*. 2017;19(7):867–80. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.04.001.

49. Hartmann J, Schussler-Lenz M, Bondanza A, Buchholz CJ. Clinical development of CAR T cells—challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol Med*. 2017;9(9):1183–97. doi: 10.15252/emmm.201607485.

50. Hagen T. Novartis Sets a Price of \$475,000 for CAR T-Cell Therapy. Available from: <http://www.onclive.com/web-exclusives/novartis-sets-a-price-of-475000-for-car-tcell-therapy> (accessed 31.10.2017).

51. Yang Y, Jacoby E, Fry TJ. Challenges and opportunities of allogeneic donor-derived CAR T cells. *Curr Opin Hematol*. 2015;22(6):509–15. doi: 10.1097/MOH.0000000000000181.

52. Li H, Zhao Y. Increasing the safety and efficacy of chimeric antigen receptor T cell therapy. *Protein Cell*. 2017;8(8):573–89. doi: 10.1007/s13238-017-0411-9.