

CAR ЗА ПРЕДЕЛАМИ КЛАССИЧЕСКИХ CAR-T: ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Обзор

© 2024 Е.П. Минина, Д.В. Дианов, С.А. Шитиков, А.В. Боголюбова*

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России,
125167 Москва, Россия; электронная почта: apollinariya.bogolyubova@gmail.com

Поступила в редакцию 14.08.2023

После доработки 23.11.2023

Принята к публикации 02.12.2023

Химерный антигенный рецептор (CAR) представляет собой генно-инженерный рецептор, распознающий антиген и вследствие этого запускающий сигнальный каскад в клетке. В распознавании и проведении сигнала участвуют домены CAR, происходящие от разных белков, поэтому CAR имеют смешанный доменный состав. Т-Клетки, несущие CAR к опухолеассоциированным антигенам, легли в основу CAR-T-терапии – нового подхода к терапии злокачественных новообразований. Несмотря на то что CAR-T-терапия показала высокую эффективность в лечении онкогематологических заболеваний, этот подход имеет ряд недостатков, которые, потенциально, могут быть устранены при использовании в качестве эффекторных клеток других типов лейкоцитов. На данный момент экспрессия CAR, приводящая к появлению или усилению цитотоксических свойств, показана для широкого спектра клеток как адаптивного, так и врожденного иммунитета. В этом обзоре будут рассмотрены особенности функционирования CAR в разных типах клеток иммунной системы. Особое внимание будет уделено результатам доклинических и клинических исследований эффективности и безопасности потенциальных CAR-клеточных продуктов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: химерный антигенный рецептор, иммунотерапия, клеточная терапия, CAR, CAR-T, CAR-NK.

DOI: 10.31857/S0320972524050019 EDN: YPHDBX

ВВЕДЕНИЕ

Химерный рецептор, состоящий из варибельного иммуноглобулинового домена и константных участков Т-клеточного рецептора (ТКР), был впервые создан в 1987 г. [1]. В этом исследовании химерный рецептор, распознающий бактериальный антиген фосфорилхолин, был экспрессирован на Т-лимфобластных клетках линии EL4. Первые Т-лимфоциты, экспрессирующие химерные антигенные рецепторы (chimeric antigen receptor, CAR),

были получены в 1993 г. [2]. CAR, созданный в этом исследовании, распознает 2,4,6-тринитрофенол и относится к числу рецепторов первого поколения. Он состоит из внеклеточного антигенраспознающего одноцепочечного варибельного фрагмента scFv (single-chain variable fragment), который соединен трансмембранным участком с внутриклеточным сигнальным доменом CD3ζ, входящим в состав эндогенного ТКР [3]. CAR-T-клетки, экспрессирующие рецептор первого поколения, оказались недостаточно эффективными в уничтожении

Принятые сокращения: РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина»; СВИ – синдром выброса цитокинов; ТКР – Т-клеточный рецептор; CAR – химерный антигенный рецептор; CAR-M – макрофаги, экспрессирующие CAR; CBCR – химерные В-клеточные рецепторы; CIK – цитокин-индуцированные киллеры; DC – дендритные клетки; DN Т-клетки – двойные негативные Т-клетки; iPSC – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; FDA – Управление по надзору за продуктами и лекарствами; GD2 – дисialogанглиозид; MAIT – ассоциированные со слизистыми инвариантные Т-клетки; MHC – главный комплекс гистосовместимости; NK – естественные киллеры; NKT-клетки – естественные киллерные Т-клетки; iNKT – инвариантные NKT-клетки; NSCAR – несигнализирующий CAR; Treg – Т-регуляторные клетки.

* Адресат для корреспонденции.

злокачественных клеток, так как, несмотря на выраженные цитотоксические свойства, быстро переходили в истощенное состояние [4]. В 2002 г. были получены CAR второго поколения, в которых между сигнальным и трансмембранным доменом находился костимуляторный домен CD28 [5]. CAR-T-клетки второго поколения, направленные против антигена CD19, показали свою эффективность в распознавании и элиминации В-клеточных опухолей в мышинной модели [6]. С тех пор активно ведутся разработки CAR-T-лимфоцитов, направленных на различные опухолеассоциированные антигены.

Особенно эффективно подход CAR-T показал себя в терапии онкогематологических заболеваний. По состоянию на 2023 г., Управление по надзору за продуктами и лекарствами (Food and Drug Administration, FDA) одобрило шесть CAR-T-клеточных терапевтических препаратов, направленных на лечение В-клеточных неоплазий [7]. На дан-

ный момент продукты CAR-T, успешно прошедшие клинические испытания и одобренные FDA, основаны на CAR второго поколения, содержащих в качестве костимуляторных доменов сигнальные домены CD28 или 4-1BB. Тем не менее на стадии клинических исследований и разработок находятся различные варианты CAR-T-терапии, химерный рецептор в которых состоит из различных иммуномодулирующих доменов. В частности, созданы рецепторы CAR третьего поколения, содержащие два костимуляторных домена, однако их применение в клинике ограничено выраженными побочными эффектами. В случае химерных рецепторов четвертого поколения CAR-T-клетки, помимо CAR, экспрессируют цитокины, которые увеличивают персистенцию CAR-T-клеток в опухолевом микроокружении [8].

Несмотря на значительные успехи CAR-T-терапии в лечении онкогематологических заболеваний, у этого подхода есть ряд недостатков.

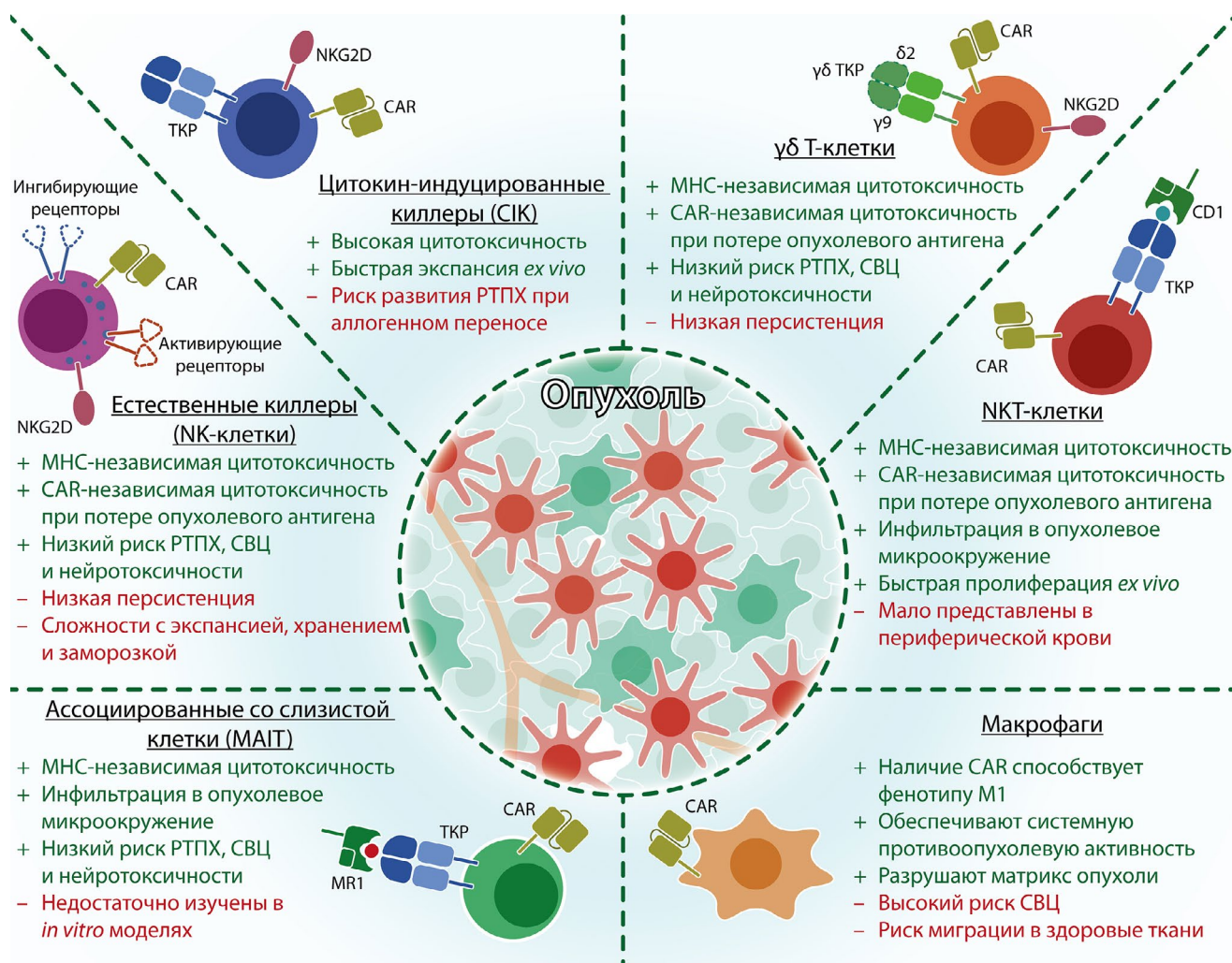


Рис. 1. Преимущества и недостатки использования различных типов клеток при создании клеточных продуктов, несущих CAR. ТКР – Т-клеточный рецептор; CAR – химерный антигенный рецептор; NKG2D – активирующий рецептор; MR1 – неканонический главный комплекс гистосовместимости, близкий к I классу; CD1 – неканонический главный комплекс гистосовместимости, близкий к I классу

Терапия становится неэффективной при утрате злокачественными клетками опухолевого антигена, на который были нацелены химерные рецепторы [8]. Кроме того, в случае солидных опухолей CAR-T-клетки зачастую не могут инфильтрировать опухоль и распознать антиген. Более того, на цитотоксическую функцию CAR-T-клеток значительно влияет иммуносупрессивное опухолевое микроокружение, поэтому в настоящее время прогресс в терапии солидных опухолей с помощью подхода CAR-T ограничен [9]. Наконец, выделение провоспалительных цитокинов активированными CAR-T-клетками может приводить к тяжелым побочным эффектам, таким как синдром выброса цитокинов (СВЦ) и нейротоксичность [10]. В целом, и СВЦ, и нейротоксичность обусловлены быстрой активацией и пролиферацией Т-клеток, продуцирующих провоспалительные цитокины. Как правило, подобный ответ развивается в течение недели после введения CAR-T-клеток. Предполагается, что чрезмерное выделение провоспалительных цитокинов повышает проницаемость капилляров в головном мозге, что может привести к тяжелым неврологическим симптомам и даже смерти. Тем не менее молекулярные механизмы нейротоксичности, развивающейся в результате CAR-T-терапии, окончательно не выяснены [10]. Нередко тяжелые побочные эффекты CAR-T-терапии обусловлены недостаточной регуляцией активности CAR-T-клеток, которые иногда могут активироваться даже при отсутствии антигенного стимула [11].

Для преодоления указанных трудностей ведется разработка новых стратегий для создания CAR-T-клеток [12, 13]. Кроме того, активно исследуется возможность применения других, отличных от Т-клеток, лейкоцитов в роли клеток, несущих CAR (рис. 1). На сегодняшний день клетки, экспрессирующие CAR, были получены из $\gamma\delta$ Т-клеток, регуляторных Т-клеток, ассоциированных со слизистыми инвариантных Т-клеток (MAIT), двойных негативных (DN) Т-клеток, естественных киллеров (NK), естественных киллерных Т-клеток (NKT-клеток), цитокин-индуцированных киллеров (CIK), макрофагов, дендритных клеток (DC) и даже В-лимфоцитов.

Доклинические исследования показали, что у многих альтернативных иммунных CAR-клеток при высокой противоопухолевой активности многие недостатки CAR-T выражены в меньшей степени либо полностью отсутствуют. Тем не менее на текущий момент такие CAR-клетки недостаточно изучены: лишь для нескольких препаратов такого рода запущены клинические испытания, находящиеся на I/II фазах, или доступны данные доклинических исследований, остальные варианты терапии находятся на стадии разработки. В этом обзоре будут подробно освещены особен-

ности функционирования CAR в разных группах иммунных клеток, а также результаты имеющихся доклинических и клинических исследований.

CAR В ИММУННЫХ КЛЕТКАХ РАЗНЫХ ТИПОВ

Ниже будут рассмотрены особенности разных типов иммунных клеток, которые могут быть использованы в разработке новых подходов CAR-опосредованной иммунотерапии. Также будут освещены актуальные результаты доклинических и, при наличии, клинических исследований по экспрессии и эффективности CAR в разных типах иммунных клеток.

Естественные киллеры или NK-клетки (от natural killers) относятся к числу клеток врожденного иммунитета лимфоидного ряда. На долю NK-клеток приходится около 10% лимфоцитов периферической крови [14]. В отличие от Т-лимфоцитов, они распознают злокачественные и инфицированные клетки организма с помощью множества неполиморфных активирующих и ингибирующих рецепторов, и направленность ответа NK-клетки в каждом случае – это результат баланса сигналов. Если по совокупности сигналы от активирующих рецепторов перевешивают таковые от ингибирующих рецепторов, то NK-клетка лизует клетку-мишень. NK-Клетки экспрессируют на своей поверхности множество активирующих и ингибирующих рецепторов, важнейшими среди которых являются рецепторы, распознающие главный комплекс гистосовместимости (main histocompatibility complex) МНС I и МНС I-подобные молекулы. Те клетки организма, которые экспонируют эти молекулы, воспринимаются NK-клетками как здоровые [15]. Отметим, что эритроциты не несут на своей поверхности ни активирующих, ни ингибирующих лигандов для рецепторов NK-клеток, и потому не распознаются ими как мишень. Помимо МНС, NK-клетки могут узнавать и другие лиганды на поверхности клеток, в частности, маркеры стресса MICA, MICB и UL16BP1 благодаря специальным рецепторам, к числу которых относится, например, рецептор NKG2D, присутствующий также на поверхности $\gamma\delta$ Т-клеток [16]. Кроме того, благодаря экспрессии Fc γ RIIIa NK-клетки могут распознавать и убивать клетки, опсонизированные антителами [17].

Цитотоксические функции NK-клеток реализуются благодаря формированию иммунологического синапса между NK-клеткой и клеткой-мишенью и последующей секреции литических гранул с гранзимом. Кроме литических гранул, NK-клетка может убивать клетку-мишень с помощью FasL и TRAIL, запуская ее программируемую гибель.

Наконец, активированные NK-клетки выделяют ряд провоспалительных цитокинов, в частности интерферона γ (IFN γ) и фактора некроза опухолей (TNF) [14].

Выраженные цитотоксические свойства, а также отсутствие, в отличие от Т-клеток, необходимости в представлении антигенов в контексте МНС для распознавания клеток-мишеней способствовали развитию противораковой терапии, основанной на генетически модифицированных NK-клетках, в том числе экспрессирующих CAR. В большинстве имеющихся исследований NK-клетки были трансдуцированы конструктами CAR, изначально разработанными для CAR-T-терапии. Помимо костимуляторных доменов CD28 и 4-1BB, некоторые из экспрессируемых в NK-клетках CAR содержат костимуляторный домен 2B4 (рис. 2). Исходно рецептор 2B4 относится к числу активирующих рецепторов NK-клеток семейства SLAM (signaling lymphocytic activation molecule). Важно отметить, что конструкты CAR, изначально созданные для экспрессии в Т-клетках, функционируют в NK-клетках благодаря общности сигнальных путей, контролирующей активацию клеток обеих групп. В частности, передача сигнала от некоторых активирующих рецепторов NK-клеток происходит при участии CD3 ζ – сигнального домена CAR, предназначенных для Т-клеток [18]. Отмечено, что NK-клетки, трансдуцированные CAR второго поколения с 2B4, направленным против CD5, отличаются от NK-клеток с CAR, содержащим CD28, повышенной цитотоксической активностью в отношении злокачественных клеток, быстрой пролиферацией и усиленной продукцией цитокинов [19]. Кроме

того, в роли сигнального домена в составе CAR для NK-клеток, помимо домена CD3 ζ , используют домены DAP10 и DAP12. Эти домены задействованы в передаче сигнала от ряда активирующих рецепторов NK-клеток. Показано, что конструкты с доменом CD3 ζ превосходят таковые с DAP10 по силе индуцируемой противоопухолевой активности, но уступают конструктам с DAP12 [20, 21]. Cifaldi et al. [22] предложили использовать DNAM-1 в составе химерного рецептора, адаптированного под NK-клетки. DNAM-1 распознает лиганды PVR и нектин-2, присутствующие на инфицированных вирусами и многих злокачественных клетках. Рецепторы, включающие, помимо DNAM-1, домены 2B4 и CD3 ζ , дополнительно активируют NK-клетки.

Стоит подчеркнуть, что NK-клетки, трансдуцированные CAR, потенциально, могут проявлять цитотоксическую активность в отношении злокачественных клеток и CAR-независимым образом благодаря собственным активирующим рецепторам, а также способности к распознаванию клеток, опсонизированных антителами [20, 23]. Наличие CAR-независимой противоопухолевой активности может дополнительно усиливать эффективность CAR-NK-терапии. Более того, разнообразие активирующих рецепторов позволяет CAR-NK распознавать и уничтожать опухолевые клетки с измененным фенотипом, выжившие после продолжительного лечения [24]. Было показано, что под действием экзогенных IL-12 и IL-18 NK-клетки приобретают фенотип, подобный клеткам памяти. Такие клетки уже показали свою эффективность на первых этапах испытаний на пациентах с рецидивирующим или резистентным острым

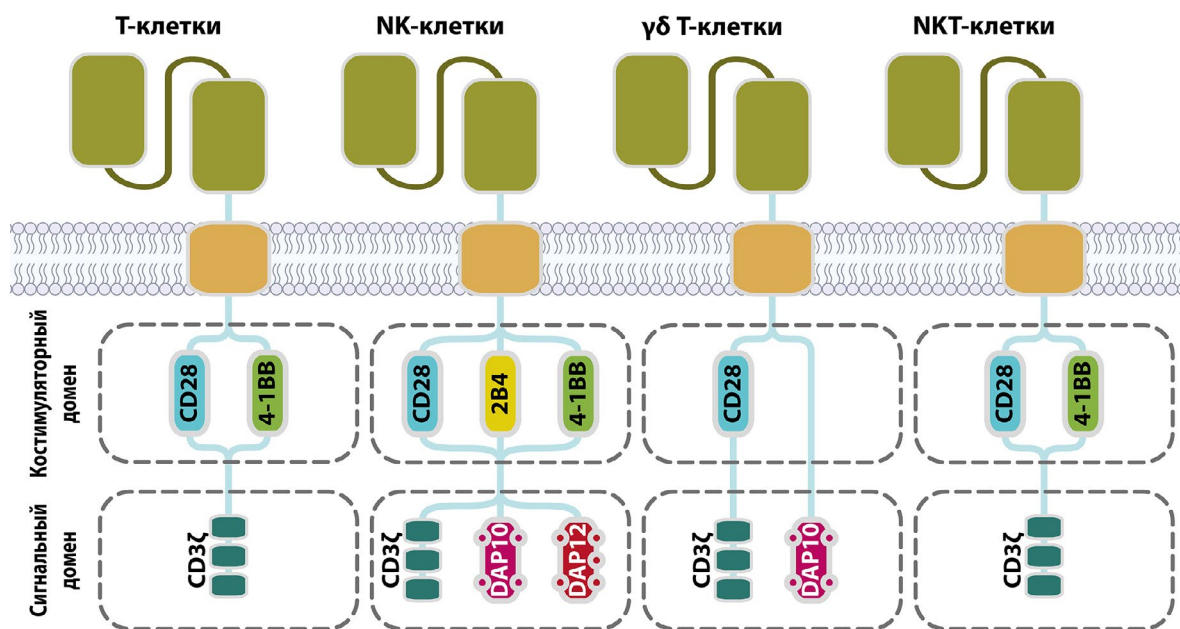


Рис. 2. Структура CAR, используемых при создании клеточного продукта из клеток различных типов. NK-Клетки – естественные киллеры, NKT-клетки – естественные киллерные Т-клетки

миелоидным лейкозом. Дополнительная экспрессия в них CAR, направленного против нуклеофозмина 1 (NPM1), увеличила эффективность терапии и снизила частоту побочных эффектов [25]. Повышенная чувствительность NK-клеток к активным формам кислорода, по сравнению с Т- и В-клетками, может быть устранена за счет экспрессии в них пероксиредоксина-1, что может улучшить персистенцию CAR-NK-клеток в закисленной среде солидных опухолей [26].

Доклинические и клинические исследования показали, что CAR-NK-клетки лишены многих недостатков CAR-T. Поскольку NK-клетки не несут варибельного Т-клеточного рецептора, их адаптивный перенос не приводит к развитию реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [27, 28]. Потенциально, это открывает дорогу к производству готовых («off the shelf») аллогенных клеточных препаратов, подходящих многим пациентам одновременно. Кроме того, перенос CAR-NK практически лишен риска СВИЦ или нейротоксичности [29, 30]. Наконец, в доклинических исследованиях CAR-NK показали себя эффективными не только в случае онкогематологических заболеваний, но и при терапии солидных опухолей [31]. Более того, на данный момент многие разработки CAR-NK-терапии, в том числе и против солидных опухолей, вышли из доклинических в клинические испытания.

В настоящее время зарегистрировано несколько десятков клинических испытаний, посвященных возможности использования CAR-NK-клеток, направленных к разным опухолевым антигенам,

как в виде самостоятельной терапии, так и в комбинации с другими терапевтическими подходами. Например, в одном исследовании испытуемые, наряду с CAR-NK против PD-L1, получают иммуностимулятор N-803, запускающий пролиферацию и активацию NK- и CD8⁺ Т-клеток, и пембролизумаб – моноклональное антитело, ингибирующее PD-1 (NCT04847466). Было показано, что NK-клетки, в которые с помощью электропорации были последовательно введены рецептор хемокина CXCR4 и CAR, направленный против BCMA, эффективно уничтожают клетки множественной миеломы [32]. Все клинические испытания CAR-NK-терапии в настоящее время находятся на I/II фазах. В ряде зарегистрированных на данный момент испытаний исследуется CAR-NK-терапия онкогематологических заболеваний, таких как множественная миелома (мишень – BCMA; NCT05008536), В-клеточные лимфомы (мишень – CD19; NCT05379647) и острый лимфобластный лейкоз (мишень – CD19; NCT05563545). Кроме того, ведутся клинические испытания эффективности и безопасности применения CAR-NK при различных солидных опухолях: раке яичников (мишень – клаудин 6; NCT05410717), толстой кишки (мишень – NKGD2L; NCT05213195), поджелудочной железы (мишень – ROBO1; NCT03941457), простаты (мишень – PSMA; NCT03692663) и других. Сведения о клинических испытаниях CAR-NK-клеток, направленных против разных мишеней, представлены в таблице. Успешное прохождение первой фазы в нескольких клинических испытаниях CAR-NK показало высокую

Некоторые зарегистрированные клинические испытания CAR-NK-клеток

Клиническое испытание	Год открытия	Фаза	Заболевание	Мишень
NCT02892695	2016	I/II	лимфомы и лейкозы	CD19
NCT03940833	2019	I/II	множественная миелома	BCMA
NCT02742727	2016	I/II	лимфомы и лейкозы	CD7
NCT02944162	2016	I/II	острый миелоидный лейкоз	CD33
NCT02839954	2016	I/II	солидные опухоли	MUCL
NCT03383978	2017	I	глиобластома	HER2
NCT03415100	2018	I	метастазирующие солидные опухоли	NKG2DL
NCT03941457	2019	I/II	рак поджелудочной железы	ROBO1
NCT03692663	2018	I	рак предстательной железы	PSMA
NCT05410717	2022	I/II	рак яичника	клаудин 6 (CLDN6)
NCT05194709	2021	I	развитые солидные опухоли	5T4
NCT05507593	2022	I	немелкоклеточный рак легкого	DLL3

безопасность этого вида терапии и практически полное отсутствие побочных эффектов [33].

Несмотря на многочисленные достоинства, в данный момент есть некоторые ограничения в использовании терапии CAR-NK. CAR-NK-клетки характеризуются низким уровнем персистенции после адоптивного переноса: если срок жизни CAR-T-клеток в организме пациента может составлять до 10 лет [34], то у CAR-NK-клеток он не превышает нескольких недель [35]. Кроме того, CAR-NK-клетки с трудом поддаются экспансии *ex vivo*, плохо переносят замораживание и хранение [36]. Тем не менее можно надеяться, что указанные сложности технического характера будут преодолены. В частности, было показано, что персистенция CAR-NK-клеток может быть увеличена вдвое за счет нокаута гена *CISH*, кодирующего белок CIS – негативный регулятор сигналинга IL-15. При отсутствии CIS в CAR-NK-клетках активируется секреция IL-15, и поскольку CAR-NK-клетки сами несут на своей поверхности рецепторы IL-15, это способствует аутокринному усилению сигнального пути IL-15. Высокая активность IL-15-опосредованного сигналинга, в свою очередь, способствует экспансии CAR-NK-клеток *ex vivo*, увеличивает персистенцию и повышает противоопухолевые свойства [37]. Вставка в конструктор CAR IL-15, кроме того, может повысить метаболический статус и активировать эффекторные функции CAR-NK-клеток, ослабленных взаимодействием с метаболически активными опухолями [38].

Еще одним фактором, способным снизить эффективность CAR-NK-терапии, является захват терапевтическими CAR-NK-клетками опухолевых антигенов по механизму трогоцитоза. Вследствие захвата опухолевого антигена CAR-NK-клетки сами становятся мишенью терапии и уничтожаются другими NK-клетками по пути фратрицида, а количество опухолевых антигенов на целевых злокачественных клетках падает. Снижению риска фратрицида среди CAR-NK-клеток способствует одновременная экспрессия в них активирующего CAR, направленного против опухолевого антигена, и ингибирующего CAR, распознающего специфичные для NK-клеток антигены [39].

γδ Т-клетки. Примерно 3,7% циркулирующих в кровотоке Т-клеток несут на поверхности ТКР, образованный γ- и δ-цепями [40, 41]. Такие «неклассические» (в противовес «классическим» αβ Т-клеткам) γδ Т-клетки значительно отличаются от αβ Т-клеток, несущих ТКР из цепей α и β и составляющих преобладающую популяцию Т-клеток кровотока. Так, распознавание антигенов αβ Т-клетками возможно, только если антиген представлен в контексте МНС. γδ Т-клетки не требуют участия классических молекул МНС в распознавании антигенов, и это обстоятельство зна-

чительно расширяет возможности для переноса γδ Т-клеток между разными организмами и существенно снижает вероятность развития осложнений, таких как РТПХ. Относительно безопасный адоптивный перенос γδ Т-клеток возможен еще и потому, что репертуары γ- и δ-цепей значительно менее разнообразны в популяции по сравнению с репертуарами цепей α и β. γδ Т-клетки, как правило, распознают общие для разных людей молекулярные сигнатуры, свидетельствующие о развитии инфекционного процесса или появлении злокачественных клеток, поэтому их нередко сближают с клетками врожденного иммунитета. На клетки врожденного иммунитета γδ Т-клетки похожи экспрессией Toll-подобных рецепторов и рецепторов, близких к активирующим рецепторам NK-клеток, в частности, уже упоминавшегося NKG2D [42]. Однако γδ Т-клетки способны и к формированию иммунологической памяти, что заставляет причислять их к компонентам адаптивного иммунитета [43]. Отмечается, γδ Т-клетки могут дифференцироваться в Th-подобные клетки и продуцировать широкий спектр цитокинов [44].

Большинство γδ Т-клеток крови относится к числу Vγ9Vδ2 Т-клеток. В состав ТКР этих клеток входят сегменты Vγ9 и Vδ2, относящиеся к цепям γ и δ соответственно. Vγ9Vδ2 Т-клетки распознают фосфоантигены, поэтому для экспансии Vγ9Vδ2 Т-клеток *ex vivo* используют их синтетические аналоги, такие как золедроновая кислота [45]. γδ Т-клетки, имеющие сегмент Vδ1 в составе ТКР, локализованы преимущественно в слизистых оболочках [23].

Роль γδ Т-клеток в обеспечении противоопухолевой защиты впервые была показана у мышей, лишенных γδ Т-клеток. Под воздействием химических мутагенов у таких мышей наблюдается раннее развитие плоскоклеточного рака кожи [46]. Впоследствии важная роль γδ Т-клеток в работе противоопухолевого иммунитета была продемонстрирована на разных моделях опухолевого роста. В частности, было показано, что уровень инфильтрации злокачественных опухолей γδ Т-клетками коррелирует с хорошим прогнозом в случае многих видов рака, например меланомы [47] и рака желудка [48]. Считается, что активность γδ Т-клеток в отношении злокачественных клеток обеспечивается их цитотоксическими свойствами, а также продукцией IFNγ и TNF [33]. Цитотоксичность γδ Т-клеток обусловлена действием перфорина и гранзимов, кроме того, клетки способны к антителозависимой клеточной цитотоксичности. Противоопухолевая активность присуща как Vγ9Vδ2, так и Vδ1 Т-клеткам [45, 48, 49].

Стоит отметить, что γδ Т-клетки не во всех случаях оказывают противоопухолевое действие: они могут проявлять и проопухолевые свойства.

Как правило, проопухолевое действие $\gamma\delta$ Т-клеток обусловлено продукцией ими интерлейкина 17 (IL-17) и ряда других цитокинов. Например, при раке поджелудочной железы $\gamma\delta$ Т-клетки могут подавлять активность $\alpha\beta$ Т-клеток, выделяя IL-10 и IL-17 и способствуя повышению уровня экспрессии PD-L1 в клетках опухоли [50].

Выраженная собственная противоопухолевая активность вкупе с высокой безопасностью адоптивного переноса делает $\gamma\delta$ Т-клетки перспективным инструментом в иммунотерапии онкологических заболеваний. Перенос пациенту немодифицированных $\gamma\delta$ Т-клеток после экспансии *ex vivo* оказался безопасным, но неэффективным [45], поэтому в последнее время активно исследуется возможность усиления противоопухолевой активности $\gamma\delta$ Т-клеток посредством экспрессии в них CAR. Показано, что CAR- $\gamma\delta$ Т-клетки, направленные против CD19, эффективно распознают и уничтожают малигнизированные клетки, в том числе утратившие CD19, причем цитотоксические свойства CAR- $\gamma\delta$ Т-клеток усиливаются после их обработки золедроновой кислотой [51, 52]. Способность CAR- $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов убивать злокачественные клетки крови, утратившие антиген, обусловлена высокой неспецифической цитотоксичностью $\gamma\delta$ Т-клеток по отношению к клеткам лейкоза, которая дополнительно усиливается под действием золедроновой кислоты в ходе экспансии CAR- $\gamma\delta$ Т-клеток *ex vivo*. Сохранение цитотоксических свойств в отношении злокачественных клеток крови, потерявших антиген, дает CAR- $\gamma\delta$ Т-клеткам важное преимущество [52].

CAR- $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть эффективны и против солидных опухолей. Так, продемонстрировано, что CAR- $\gamma\delta$ Т-клетки, направленные на антиген нейробластомы дисиалоганглиозид (GD2), не только лизируют злокачественные клетки, но и презентруют антигены $\alpha\beta$ Т-клеткам, активируя их в условиях *in vitro*. Возможно, CAR- $\gamma\delta$ Т-клетки могут эффективно представлять антигены и активировать $\alpha\beta$ Т-клетки *in vivo*, однако для прояснения этого вопроса необходимы дальнейшие эксперименты [23].

Большинство CAR, которые на данный момент удалось успешно экспрессировать в $\gamma\delta$ Т-клетках, относятся к числу рецепторов второго поколения и содержат домены CD28 и CD3 ζ в качестве костимуляторного и сигнального доменов соответственно [23] (рис. 2). В одном исследовании в $\gamma\delta$ Т-клетки была внесена генетическая конструкция CAR первого поколения, имеющего единственный внутриклеточный домен DAP10 и распознающего GD2 [53]. Отметим, что в $\gamma\delta$ Т-клетках экспрессируются такие костимулирующие молекулы, как CD28, CD27 и 4-1BB, которые способствуют активации этих клеток при передаче сигналов от CAR [54].

В ряде исследований в $\gamma\delta$ Т-клетках была создана система комбинаторного распознавания антигена, функционирующая как логические операторы. Например, Fisher et al. [53] получили CAR- $\gamma\delta$ Т-клетки, у которых упомянутый DAP10-CAR распознает GD2, а $\gamma\delta$ -ТКР связывается с фосфоантигенами, которые экспрессируются злокачественными клетками и почти не экспрессируются нормальными клетками. Активация таких CAR- $\gamma\delta$ Т-клеток достигается только при взаимодействии с клетками-мишенями, экспонирующими оба антигена, которые распознаются CAR и ТКР, что снижает вероятность уничтожения нецелевых клеток.

Fleischer et al. [53] получили $\gamma\delta$ Т-клетки, экспрессирующие несигнализирующий CAR (NSCAR), лишенный внутриклеточных активационных доменов, и потому не способный запускать цитотоксическую реакцию при распознавании антигена. $\gamma\delta$ Т-клетки, экспрессирующие NSCAR, могут с его помощью распознавать опухолевые антигены CD19 и CD5 и благодаря этому взаимодействию сближаться со злокачественными клетками в пространстве. Тем не менее для прямой противоопухолевой активности необходима эндогенная МНС-независимая цитотоксичность $\gamma\delta$ Т-клеток. Показано, что $\gamma\delta$ Т-клетки, экспрессирующие NSCAR, отличаются более выраженной цитотоксичностью в отношении клеток В- и Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза соответственно по сравнению с $\gamma\delta$ Т-клетками, экспрессирующими CAR против тех же антигенов (CD19 и CD5). Примечательно, что в случае $\alpha\beta$ Т-клеток экспрессия NSCAR вместо CAR не привела к значимому усилению цитотоксических свойств, из чего можно сделать вывод, что молекулярные механизмы, которые лежат в основе увеличения противоопухолевой активности $\gamma\delta$ Т-клеток при экспрессии NSCAR, фундаментально отличаются от таковых у $\alpha\beta$ Т-клеток [55].

В настоящее время проходит несколько клинических испытаний, посвященных возможностям использования CAR- $\gamma\delta$ Т-клеток в иммунотерапии онкологических заболеваний, а именно: острого миелоидного лейкоза (мишени – CD33, CD123; NCT03885076, NCT04796441), рецидивирующего или резистентного CD7⁺ Т-клеточного лейкоза (мишень – CD7; NCT04702841), различных В-клеточных онкогематологических заболеваний (мишени – CD20, CD19; NCT04735471, NCT02656147, NCT04911478), а также рецидивирующих или резистентных солидных опухолей различного генеза (мишень – NKG2DL; NCT04107142, NCT05302037). На данный момент все перечисленные клинические испытания находятся на I фазе, поэтому судить о клинической эффективности CAR- $\gamma\delta$ Т-клеток пока преждевременно. Предполагается, что терапия на основе CAR- $\gamma\delta$ Т-клеток будет иметь преимущество, по сравнению с традиционной

CAR-T-терапией, в плане пониженного риска развития таких побочных эффектов, как СВИЦ и нейротоксичность [49]. Стоит отметить, что исследования функционирования CAR- $\gamma\delta$ T-клеток *in vivo* показали, что эти клетки могут лишь недолго персистировать в организме [52], что может быть существенным ограничением их применения в клинике.

NKT-Клетки (от natural killer T cells), как и $\gamma\delta$ T-клетки, объединяют в себе свойства клеток адаптивного и врожденного иммунитета. NKT-Клетки составляют менее 1% от T-клеток крови [56] и экспрессируют $\alpha\beta$ ТКР, а также молекулы, характерные для NK-клеток, такие как CD16 (Fc γ R) и CD56 [57]. В отличие от T-лимфоцитов, NKT-клетки распознают антигены только в контексте CD1d – неклассической молекулы МНС, близкой к МНС I класса. NKT-Клетки принято подразделять на инвариантные NKT-клетки (iNKT), или NKT-клетки I типа, и NKT-клетки II типа. iNKT-Клетки характеризуются ограниченным репертуаром ТКР и распознают α -галактозилцерамид (α -GalCer), а NKT-клетки II типа отличаются более широким репертуаром ТКР и не распознают α -GalCer [58].

Отмечено, что у пациентов с различными злокачественными новообразованиями, в частности, онкогематологическими, зачастую снижается количество NKT-клеток в крови [59], а также нарушаются их функции, например продукция IFN γ [60]. Кроме того, повышенное количество NKT-клеток в периферической крови, как и инфильтрация NKT-клеток в опухоль, как правило, коррелируют с благоприятным прогнозом для пациента [61, 62]. Выраженным противоопухолевым эффектом обладают только iNKT, а NKT-клетки II типа могут даже подавлять иммунный ответ против злокачественных клеток. Цитотоксичность iNKT, опосредованная гранзимами или FasL, активируется в результате распознавания липидного антигена, связанного с CD1d [63]. Помимо прямого лизиса опухолевых клеток, iNKT-клетки могут модулировать активность других иммунных клеток (в частности, DC, NK-, В- и Т-клеток) посредством секреции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, таких как IFN γ , TNE, IL-4, IL-10 и IL-13 [64, 65]. Цитокины, выделяемые iNKT-клетками, могут также влиять на опухолевое микроокружение, непрямым образом воздействуя на противоопухолевый иммунный ответ [64]. Показано, что NKT-клетки с транзиторной экспрессией CAR продуцируют меньше IL-6, чем трансдуцированные CD8⁺ CAR-T-лимфоциты, и при этом сохраняют цитотоксическую активность. По этой причине предполагается, что риск развития СВИЦ при терапии CAR-NKT будет ниже, чем в случае CAR-T, но для прояснения этого вопроса необходимы дальнейшие исследования [66].

Ряд свойств NKT-клеток делает их особенно привлекательными эффекторами CAR-терапии. Собственная противоопухолевая активность, включающая не только цитотоксические свойства, но и способность к перестройке опухолевого окружения, может дополнять CAR-опосредованное действие против злокачественных клеток. Поскольку NKT-клетки распознают антигены в контексте неполиморфного CD1d, их аллогенный адаптивный перенос не вызывает РТПХ, благодаря чему становится возможным создание аллогенных CAR-iNKT из клеток здоровых доноров [23]. Кроме того, NKT-клетки способны к быстрой пролиферации *ex vivo*, благодаря чему необходимое для создания клинического продукта количество клеток может быть получено сравнительно легко [56].

В первой работе, посвященной получению CAR-iNKT-клеток, в iNKT-клетках был экспрессирован CAR против антигена нейробластомы GD2 с сигнальными доменами 4-1BB и CD3 ζ (рис. 2). Было показано, что 4-1BB обеспечивает поляризацию CAR-iNKT в фенотип Th1, поэтому CAR-iNKT в условиях *in vivo* эффективно уничтожали клетки нейробластомы, при этом длительно персистируя в организме [67]. Впоследствии было показано, что экспрессия CD62L является маркером повышенной персистенции и противоопухолевой активности NKT-клеток, в том числе несущих CAR. Введение анти-CD19 CAR-NKT-клеток, экспрессирующих CD62L, мышам с В-клеточной лимфомой позволило добиться значительной регрессии заболевания [68]. Исследование эффективности CAR-NKT-клеток, распознающих антиген клеток меланомы хондроитинсульфатпротеогликан 4 (CSPG4), показало, что CAR-NKT уничтожают клетки меланомы *in vitro* не менее эффективно, чем CAR-T [69]. Недавно было объявлено о получении NKT-клеток, экспрессирующих CAR третьего поколения, направленный против глипикана-3 (антигена клеток гепатоцеллюлярной карциномы) и содержащий два костимуляторных домена – CD28 и 4-1BB [70].

Успехи в доклиническом применении CAR-NKT-клеток привели к запуску клинических испытаний CAR-NKT в терапии нейробластомы (мишень – GD2; NCT03294954, NCT02439788), а также рецидивирующей или резистентной В-клеточной лимфомы (мишень – CD19; NCT03774654) и других В-клеточных неоплазий (мишень – CD19; NCT05487651). Малое количество клинических испытаний CAR-NKT на данный момент, вероятно, связано с недостаточным объемом доклинических исследований. Также стоит отметить, что существенным ограничением для получения клинического продукта из CAR-NKT-клеток является малая численность NKT-клеток в периферической крови.

Регуляторные Т-клетки (regulatory T cells, Tregs) – специализированная подгруппа CD4⁺ Т-лимфоцитов, выполняющих иммуносупрессивную функцию. На долю регуляторных Т-клеток приходится от 5 до 10% CD4⁺ Т-клеток в кровотоке [71]. Ингибирующее действие регуляторных Т-клеток на эффекторные Т-клетки или антигенпрезентирующие клетки может быть прямым или косвенным. В первом случае регуляторная Т-клетка воздействует на клетку-мишень с помощью выделения противовоспалительных цитокинов, таких как IL-35, IL-10 или TGF- β , или высвобождения гранзимы из литических гранул, что приводит к гибели мишени. Косвенные механизмы включают воздействие на мишень не самой регуляторной Т-клетки, а других клеток, подвергшихся действию регуляторных Т-клеток [72].

Способность регуляторных Т-клеток ингибировать эффекторные иммунные клетки делает потенциально возможным их использование в терапии заболеваний и состояний, связанных с избыточной иммунной реакцией, например, при трансплантации. Однако первые исследования терапевтических свойств поликлональных регуляторных Т-клеток показали, что их адоптивный перенос индуцирует неспецифическую толерантность, снижает сопротивляемость организма инфекциям и повышает риск развития злокачественных новообразований [73]. Экспрессия CAR дает возможность направить регуляторные Т-клетки прицельно в ткань-мишень, сохраняя исходную ингибирующую активность этих клеток, но в то же время избегая индукции нежелательной иммунологической толерантности. Первые созданные CAR-Treg были предназначены для терапии колита в мышинной модели [74], а вскоре было сообщено о получении первых CAR-Treg человека [75].

В большинстве исследований CAR-Treg, опубликованных на данный момент, регуляторные Т-клетки экспрессируют CAR второго поколения, и в качестве костимуляторного домена выступают CD28 или 4-1BB. Систематический анализ активности CAR второго поколения, направленных против человеческого лейкоцитарного антигена HLA-A2, с различными костимуляторными доменами в регуляторных Т-клетках показал, что в этих клетках лучше всего функционирует CAR с CD28 в своем составе. Дополнительно увеличивает супрессивные свойства таких клеток экспрессия в них IL-10 [76]. Установлено, что, в отличие от классических CAR-T, CAR-Treg с доменом CD28 отличаются лучшей персистенцией, чем с 4-1BB [77, 78]. Кроме того, в настоящее время исследуются регуляторные Т-клетки, экспрессирующие CAR третьего поколения, которые содержат и CD28, и 4-1BB костимуляторные домены [79–81].

За более чем 10 лет, прошедших с момента создания первых CAR-Treg, были получены CAR-Treg разной специфичности, характеризующиеся высокой эффективностью, стабильностью и увеличенной персистенцией в мышинных моделях [82]. Кроме того, по сравнению с CAR-T, CAR-Treg отличаются сниженной потребностью в IL-2 [83]. В мышинных моделях показан эффект CAR-Treg в предотвращении или уменьшении симптомов РТПХ, заболеваний, связанных с чрезмерной активностью иммунной системы, гемофилии и других болезней [73]. На данный момент только одно исследование, посвященное CAR-Treg, перешло на стадию клинических испытаний (NCT04817774). В рамках этого исследования оценивается эффективность и безопасность использования CAR-Treg при пересадке почки. В этом исследовании CAR распознает HLA-A2 в органе-реципиенте, и за счет этого CAR-Treg привлекаются к нему, подавляя иммунный ответ.

Т-Лимфоциты, ассоциированные со слизистыми. Ассоциированные со слизистыми инвариантные Т-клетки (mucosal-associated invariant T cells, MAIT) в качестве антигенов распознают метаболиты витаминов B2 и B9 бактериального происхождения в комплексе с неклассической молекулой MHC MR1 [84]. На долю MAIT может приходиться от 1 до 8% Т-клеток периферической крови [85]; также эти клетки локализуются в слизистых оболочках и лимфоидной ткани. ТКР MAIT состоит из практически неполиморфных цепей α и β , и большая часть MAIT экспрессирует CD8. Эти клетки содержат гранулы с гранзимами и обладают цитотоксическими свойствами [86], а в активированном состоянии секретируют провоспалительные цитокины IFN γ , TNF и IL-17 [87].

MAIT участвуют в защите от инфекций преимущественно бактериальной природы, а также вовлечены в патогенез многих неинфекционных болезней, таких как аутоиммунные заболевания, воспалительное заболевание кишечника, целиакия, а также злокачественные заболевания [84]. Отмечено, что уровень MAIT в кровотоке снижается при раке толстой кишки, причем клетки мигрируют в опухоль и оказывают противоопухолевое цитотоксическое действие, выделяя гранзимы [88]. Уменьшение количества MAIT наблюдается и у пациентов с множественной миеломой [89]. В некоторых случаях MAIT, активно мигрирующие в опухоль, подвергаются иммуносупрессивному влиянию опухолевого микроокружения и утрачивают способность к секреции IFN γ [90].

Тот факт, что MAIT сами по себе активно инфильтрируют опухолевую среду, кроме того, их цитотоксические свойства могут быть использованы в разработке иммунотерапии опухолей. Поскольку MAIT распознают только антигены,

связанные с неклассической молекулой МНС I класса MR1, вероятность развития РТПХ при использовании CAR-MAIT будет ниже, чем в случае цитотоксических CAR-T [23]. Dogan et al. [86] экспрессировали CAR против антигенов CD19 или HER2 в первичных MAIT человека. Полученные CAR-MAIT демонстрировали цитотоксические свойства по отношению к клеткам В-клеточной лимфомы и рака молочной железы соответственно. Показано, что активированные CAR-MAIT по цитотоксичности в отношении клеток-мишеней не уступали CD8⁺ CAR-T-лимфоцитам, однако продуцировали значительно меньше IFN γ и других провоспалительных цитокинов. Последнее наблюдение дает основания полагать, что вероятность развития СВИ и нейротоксичности при введении CAR-MAIT в организм пациента будет ниже, чем в случае CAR-T [87]. Тем не менее для дальнейшей оценки безопасности и противоопухолевых свойств CAR-MAIT необходимы их исследования *in vivo* с использованием лабораторных животных, а также клинические испытания.

Двойные негативные Т-клетки. DN Т-клетки характеризуются экспрессией CD3 при отсутствии экспрессии как CD4, так и CD8. Для DN Т-клеток также характерна экспрессия CD25 [91], который на высоком уровне экспрессируют Treg. ТКР DN Т-клеток могут быть представлены как $\alpha\beta$ -, так и $\gamma\delta$ -цепями. На долю DN Т-клеток приходится от 3 до 5% Т-клеток крови [92]. DN Т-клетки обладают выраженным супрессивным действием в отношении различных групп иммунных клеток (CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, В-клеток и NK-клеток), которое было отмечено как *in vitro*, так и *in vivo*. Благодаря этому DN Т-клетки играют важную роль в предотвращении РТПХ и поддержании толерантности в отношении алло- или ксенотрансплантата [93–95]. Таким образом, DN Т-клетки можно рассматривать как неканоническую подгруппу Treg.

Несмотря на иммуносупрессивное действие в отношении многих иммунных клеток, DN Т-клетки обладают собственными МНС-независимыми цитотоксическими свойствами. DN Т-клетки могут запускать гибель злокачественных клеток через FasL [96], TRAIL и другие поверхностные белки, ассоциированные с цитотоксичностью [97]. Кроме того, они экспрессируют перфорин и гранзим, а также продуцируют TNF и IFN γ [97]. Помимо МНС-независимой цитотоксичности, DN Т-клетки обладают и другими свойствами, которые делают потенциально возможным их использование в иммунотерапии злокачественных заболеваний: легкость экспансии *ex vivo* [98], отсутствие внеопухолевой цитотоксической активности и сниженный риск отторжения после аллогенного переноса [99].

Возможность экспрессии CAR в DN Т-клетках исследована слабо. В 2022 г. Vasic et al. [99] сообщали о получении DN Т-клеток, несущих CAR

против CD19, и сравнили их противоопухолевые свойства с таковыми у традиционных CAR-Т-клеток, также направленных против CD19. Авторы заявили, что CAR-DN Т-клетки по противоопухолевым свойствам как *in vitro*, так и *in vivo* не уступали традиционным CAR-Т-клеткам, однако не вызывали РТПХ [99]. Тем не менее полученные результаты требуют независимого подтверждения в других исследованиях.

Цитокин-индуцированные киллеры (CIK от cytokine induced killers) – гетерогенная группа CD8⁺ Т-клеток, фенотипически и функционально близких к NK-клеткам [100, 101]. CIK происходят из CD3⁺ Т-лимфоцитов, которые в процессе экспансии начинают экспрессировать CD56. Исходно CIK были получены из лимфокин-ассоциированных киллеров (лимфоцитов, приобретающих способность к лизису опухолевых клеток после инкубации с IL-2 [102]) в ходе оптимизации протокола их экспансии. Лимфокин-ассоциированные киллеры (lymphokine associated killer, LAK) были получены еще в 1980-х гг. [103], однако, несмотря на их выраженные цитотоксические свойства в отношении опухолевых клеток, затрудненная экспансия *ex vivo* ограничила возможности их применения. Строго регулируемое по времени добавление к LAK IFN γ , IL-2 и моноклонального антитела к CD3, обладающего митогенным действием, привело к получению CIK [104]. В настоящее время эти клетки можно относительно дешево получить из Т-клеток периферической или пуповинной крови.

Цитотоксическое действие CIK требует участия рецептора NKG2D и проявляется в высвобождении содержимого литических гранул с гранзимом. С помощью NKG2D CIK распознают на поверхности клетки-мишени стресс-индуцируемые молекулы, такие как UL16BP и MICA/MICB [105]. Сигналинг через ТКР также остается возможным, поэтому долгое время использование CIK ограничивалось аутологичной терапией из опасения острой РТПХ. Однако недавно была показана относительная безопасность применения CIK на базе донорских клеток после аллотрансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Предполагается, что это связано с короткой персистенцией терминально дифференцированных CD3⁺ CD56⁺-клеток, а также с пониженной экспрессией некоторых хоминговых рецепторов [106].

Благодаря выраженным цитотоксическим свойствам, способности к быстрой экспансии *ex vivo* и распознаванию опухолевых клеток с помощью NKG2D, а также безопасности при аллогенном адоптивном переносе CIK рассматриваются как перспективные эффекторы CAR-клеточной терапии [107]. В нескольких доклинических исследованиях была показана эффективность CAR-CIK

против гематологических и солидных опухолей. Например, продемонстрировано, что CIK, экспрессирующие CAR против CD19, содержащий домены CD28/4-1BB и CD3 ζ , эффективно уничтожают клетки В-клеточного острого лимфобластного лейкоза [108, 109]. CIK, несущие CAR к соответствующим опухолевым антигенам, эффективно уничтожали клетки рака толстой кишки, острого миелобластного лейкоза, саркомы мягких тканей и других видов опухолей [107]. Для некоторых CAR было отмечено, что их экспрессия в CIK приводит к увеличению продукции IFN γ и TNF по сравнению с CIK, не экспрессирующими CAR [110, 111].

По состоянию на 2022 г. зарегистрировано одно клиническое испытание CAR-CIK, в котором исследуется эффективность и безопасность CD19-CAR-CIK при остром лимфобластном лейкозе (NCT03389035). Таким образом, для получения информации об эффективности CAR-CIK требуется дальнейшее изучение.

Макрофаги. Специализированные фагоцитирующие клетки тканей, макрофаги, интенсивно инфильтрируют строму солидных опухолей и являются важным компонентом опухолевого микроокружения. Распознавая чужеродные агенты с помощью рецепторов врожденного иммунитета, в первую очередь Toll-подобных и NOD-подобных рецепторов, макрофаги активируются и продуцируют провоспалительные цитокины, такие как TNF, IL-1 β , IL-6, IL-12 и IL-23, которые воздействуют на многие клетки в микроокружении опухоли и, в частности, способствуют противоопухолевой активности Т- и NK-клеток. Описанные макрофаги с провоспалительными свойствами имеют так называемый М1-фенотип. Макрофаги фенотипа М2, напротив, препятствуют воспалению и развитию противоопухолевого Т-клеточного иммунитета и способствуют росту опухоли, продуцируя цитокины IL-4, IL-5 и IL-13. Основная физиологическая роль М2-макрофагов заключается в заживлении ран [112]. Макрофаги, находящиеся в опухолевом микроокружении, известны как ассоциированные с опухолями макрофаги (tumor associated macrophages, TAM). TAM с фенотипом М2 способствуют росту и метастазированию опухоли, а также обладают иммуносупрессивными свойствами [66]. Таким образом, важной задачей противоопухолевой иммунотерапии, действующей TAM, является их поляризация в направлении фенотипа М1, способствующего уничтожению неоплазии.

Способность макрофагов к фагоцитозу может быть усилена за счет экспрессии в них CAR, несущих внутриклеточные домены, которые запускают сигнальные пути активации фагоцитоза. В одном из первых исследований, посвященных CAR-макрофагам (CAR-M), первичные моноциты человека были трансдуцированы CAR против карцино-

эмбрионального антигена (CEA) с CD64 (Fc γ RI) в качестве сигнального домена. Полученные CAR-M обладали противоопухолевой активностью *in vitro* и *in vivo*, однако ее молекулярный механизм был неясен [113]. Дальнейшие исследования показали, что экспрессия CAR, содержащих рецептор фагоцитоза Megf10 или Fc γ R в качестве сигнальных доменов, усиливает фагоцитарную активность макрофагов [114, 115]. На интенсивности фагоцитоза положительно сказывается и экспрессия CAR с сигнальным доменом CD3 ζ , гомологичным Fc γ RI.

Продemonстрировано, что макрофаги, экспрессирующие CAR против CD19 с доменами Megf10 или Fc γ R, эффективно уничтожают CD19-положительные опухолевые клетки, причем полный фагоцитоз клеток имеет место лишь в небольшой доле случаев, и большую часть злокачественных клеток макрофаги уничтожают посредством трогоцитоза [116]. Zhang et al. [116] получили макрофаги, экспрессирующие анти-CD19 CAR второго поколения с сигнальным доменом CD3 ζ и костимулирующим доменом 4-1BB, из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC). Такие макрофаги фагоцитировали опухолевые клетки в культуре и продуцировали провоспалительные цитокины, однако *in vivo* оказывали лишь минимальный эффект на рост опухоли [117].

Установлено, что сама процедура создания CAR-M запускает их поляризацию в провоспалительные клетки. В частности, показано, что трансдукция аденовирусным вектором, кодирующим CAR, и последующая экспрессия CAR поляризует макрофаги в направлении фенотипа М1, который сохраняется в опухолевом микроокружении [118]. Более того, CAR-M способны к кросс-презентации опухолевых антигенов после фагоцитоза. Установлено, что макрофаги, экспрессирующие CAR против HER2 (антиген клеток рака молочной железы), фагоцитируют опухолевые клетки и презентуют процессированные антигены. Показано, что CAR-M запускают системный противоопухолевый иммунитет [119]. На мышинной модели рака яичника было показано, что однократное введение CAR-M существенно повышает выживаемость и замедляет развитие опухоли, однако у всех мышей в конечном итоге рост опухоли возобновлялся [115]. Тем не менее способность CAR-M превращать микроокружение опухоли в провоспалительную среду делает потенциально возможным их применение в качестве дополнения к CAR-T или другим видам иммунотерапии.

Макрофаги могут продуцировать матриксные металлопротеиназы, которые вызывают значительные перестройки межклеточного матрикса опухоли и влияют на архитектуру новообразования, и это их свойство также может быть использовано в CAR-терапии. Было показано, что экспрессия CAR

со специфичностью к HER2 и с CD147 в качестве трансмембранного и внутриклеточного домена в макрофагах стимулирует секрецию ими матриксных металлопротеиназ. На мышинной модели рака молочной железы было продемонстрировано, что введение указанных CAR-M приводит к перестройке опухолевого матрикса, которая способствует инфильтрации Т-клеток в опухоль. Отмечается, что в крови больных мышей, участвующих в эксперименте, были снижены уровни провоспалительных цитокинов, ассоциированных с СВЦ (IFN γ , TNF и IL-6), в то время как в самой опухоли уровни IL-12 и IFN γ были повышены [120]. Можно предположить, что терапия CAR-M будет сопряжена с пониженным риском развития СВЦ.

Имеющихся на данный момент сведений недостаточно, чтобы делать выводы об эффективности и безопасности CAR-M-терапии для человека. То обстоятельство, что макрофаги являются одним из основных типов клеток, запускающих СВЦ, делает необходимой более детальную проверку безопасности CAR-M. Кроме того, моноциты периферической крови отличаются гетерогенностью, и есть вероятность, что полученные из них CAR-M при системном применении будут чаще перемещаться не в опухоль, а в здоровые ткани [23], что может привести к выраженным побочным эффектам со стороны различных систем органов. На данный момент в клинические испытания вышла только одна разработка CAR-M, направленных против солидных опухолей со сверхэкспрессией HER2 (NCT04660929).

Дендритные клетки. Будучи профессиональными антигенпрезентирующими клетками, DC задействованы как в созревании наивных Т-клеток, так и в реактивации Т-клеток памяти. Во время презентации антигена Т-клеткам DC продуцируют цитокины, модулирующие активность Т-клеток. DC, находясь в микроокружении опухоли, могут как вызывать иммунную толерантность, так и способствовать развитию противоопухолевого иммунного ответа [121, 122]. Кроме того, DC способны к кросс-презентации опухолевых антигенов цитотоксическим CD8⁺ Т-клеткам, тем самым усиливая противоопухолевый ответ [123].

Потенциал DC, экспрессирующих CAR, как способа управления противоопухолевой активностью CAR-T-клеток изучен слабо. Suh et al. [123] исследовали возможность использования DC, экспрессирующих CAR (CAR-DC), для привлечения в опухолевую среду и активации CAR-T-клеток посредством секреции цитокинов. Показано, что экспрессия CAR к CD33 в DC способствует их перемещению в костный мозг у мышей с острым миелоидным лейкозом. Кроме того, у мышей, получивших CAR-DC и CAR-T, также направленных против CD33, значительно повышались уров-

ни IL-12, IFN γ и TNF, кроме того, возросла общая выживаемость по сравнению с мышами, получившими только CAR-T. Таким образом, одновременное введение CAR-DC и CAR-T существенно увеличивает эффективность уничтожения злокачественных клеток [124]. Стоит отметить, что безопасность возможного клинического применения CAR-DC должна быть особенно тщательно изучена, поскольку секретируемый IL-12 в высокой концентрации может обладать системным токсическим действием [125]. На сегодняшний день нет ни одного зарегистрированного клинического испытания, посвященного CAR-DC.

В-Клетки. Помимо Т-клеток и клеток врожденного иммунитета, интерес для CAR-технологии представляют и В-клетки. Благодаря способности дифференцироваться в долгоживущие плазматические клетки, секретирующие антитела, В-лимфоциты могут стать безопасным и контролируемым источником терапевтических моноклональных антител, а экспрессия в них CAR к определенным опухолевым антигенам делает возможной таргетную доставку антител, лишённую побочных эффектов системного введения последних.

Несмотря на привлекательную перспективу, исследования экспрессирующих CAR В-клеток и их терапевтического применения на данный момент ограничены. Возможность лентивирусной трансдукции В-клеток и последующей экспрессии CAR в них была показана в 2018 г., когда был описан пациент с рецидивом В-клеточной лимфомы, возникшей от единственного В-клеточного клона, случайно трансдуцированного CAR [126]. Вскоре Pesch et al. [126] продемонстрировали, что гены, кодирующие химерные В-клеточные рецепторы (CBCR), можно внедрять в В-клетки с помощью геномного редактирования методом CRISPR/Cas9. Структура CBCR, использованного в этой работе, включала трансмембранный участок CD28 и CD79 β , сигнальный домен BCR вместо классического CD3 ζ . Внедрение гена, кодирующего CBCR указанного состава, в первичные В-клетки мыши привело к обильному представлению CBCR на их поверхности и дало им возможность распознавать антигены без участия собственных В-клеточных рецепторов [127]. На данный момент противоопухолевая активность и терапевтическая эффективность В-клеток, экспрессирующих химерные рецепторы, остается неизвестной, равно как и их безопасность для человека.

ОДНА МИШЕНЬ – НЕСКОЛЬКО ТИПОВ CAR-КЛЕТОК

В первых исследованиях, посвященных противоопухолевому действию лейкоцитов разных типов,

экспрессирующих CAR, в качестве мишеней для химерных рецепторов использовался небольшой набор опухолеассоциированных антигенов, среди которых CD19, GD2 и другие. На сегодняшний день CAR-клетки, эффективно распознающие некоторые опухолевые антигены, были получены из разных типов лейкоцитов. Полученные из разных источников CAR-клетки, распознающие один и тот же опухолевый антиген, потенциально, создают пространство для маневра при выборе оптимальной терапии для каждого пациента, поскольку эффекторные свойства разных групп лейкоцитов отличаются.

Четыре из шести препаратов CAR-T, одобренных FDA на данный момент, направлены против антигена CD19 и предназначены для терапии В-клеточных неоплазий. Несмотря на продемонстрированную высокую эффективность, анти-CD19 CAR-T-терапия дает опасные побочные эффекты, в первую очередь СВИЦ и нейротоксичность, у значимой доли пациентов. Так, применение препарата Axicabtagene ciloleucel, представляющего собой CAR-T-клетки с костимуляторным доменом CD28 и сигнальным доменом CD3 ζ , вызывает СВИЦ у 93% и нейротоксичность – у 67% пациентов [128, 129]. К настоящему моменту CAR-клетки, эффективно распознающие CD19-положительные злокачественные клетки и уничтожающие их, были получены из $\gamma\delta$ Т-клеток [52], MAIT-клеток [87], NKT-клеток [68], NK-клеток [29], DN Т-клеток [100], CIK [108] и макрофагов [114, 115]. Регуляторные Т-клетки, экспрессирующие CD19, были созданы для подавления продукции антител и предотвращения РТПХ [130].

Доклинические исследования, а также исследования на небольших группах пациентов показали, что анти-CD19 CAR-клетки, отличные от цитотоксических Т-клеток, демонстрируют выраженный противоопухолевый эффект при меньшей, чем при CAR-T, частоте побочных эффектов. Однако многие из упомянутых клеточных продуктов пока не вышли на полномасштабные клинические испытания, а те продукты, для которых запущены клинические испытания, на данный момент находятся только на начальных фазах, поэтому делать выводы относительно их безопасности и эффективности преждевременно.

Еще два препарата CAR-T, одобренных FDA, Idecabtagene vicleucel и Ciltacabtagene autoleucel, направлены против антигена BCMA и предназначены для терапии множественной миеломы. Как и в случае с терапией анти-CD19 CAR-T, высокая эффективность этих препаратов сочетается со значительным риском СВИЦ или нейротоксичности: в случае Idecabtagene vicleucel эти риски составляют 76% и 42%, в случае Ciltacabtagene autoleucel – 92% и 20% соответственно [131, 132]. Заявлено о полу-

чении CAR-NK-клеток, нацеленных на распознавание BCMA [133], однако разработка пока не поступила в клинические исследования.

В случае терапии солидных опухолей также существуют примеры получения CAR-клеток из разных лейкоцитов, направленных на один опухолеассоциированный антиген. Так, CAR-клетки, распознающие GD2 (антиген нейробластомы), были получены из $\gamma\delta$ Т-клеток и NKT-клеток. На данный момент на этапе клинических испытаний находятся только CAR-NKT-клетки, распознающие GD2, но и это испытание находится только на первой фазе, поэтому безопасность и эффективность обоих клеточных продуктов еще нуждается в проверке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Последние 20 лет ознаменовались громкими успехами подхода CAR-T в терапии онкогематологических заболеваний, и уже шесть CAR-T-препаратов были одобрены FDA для клинического использования. Несмотря на недостатки «традиционных» CAR-T, долгое время исследование возможностей получения CAR-клеток из других лейкоцитов не получало должного внимания. Результаты доклинических исследований эффективности и безопасности CAR-клеток, проведенных на культурах клеток и мышиных моделях, свидетельствуют о потенциальной возможности использования широкого спектра CAR-клеток для терапии онкологических заболеваний у человека, включая солидные опухоли. Систематический обзор накопленных данных по экспрессии в разных группах лейкоцитов CAR к различным мишеням приводится в таблице в статье Qin et al. [33]. Тем не менее на данный момент даже клеточные продукты, которые проходят клинические исследования, находятся только на I/II фазах испытаний, при том что подавляющее большинство разработок терапевтических препаратов на основе CAR-экспрессирующих иммунных клеток пока не продвинулось дальше доклинических исследований.

Хотя альтернативные CAR-клеточные продукты могут обладать важными преимуществами перед традиционными CAR-T, такими как сниженный риск развития СВИЦ и нейротоксичности в ходе терапии, по ряду параметров CAR-T пока остается впереди. Поскольку сигнальные пути, стоящие за активностью CAR, отличаются в разных группах клеток адаптивного и врожденного иммунитета, при создании CAR для экспрессии в иммунных клетках разных типов критически важное значение имеет выбор костимуляторных и сигнальных доменов. Включение в состав CAR домена, который недостаточно функционален в клетках данного типа, может привести к снижению активности CAR

и, как следствие, уменьшению терапевтической эффективности. Например, в случае макрофагов сигнальный домен *Megf10* в составе CAR оказывается эффективнее, чем *CD3ζ*, который оптимально функционирует в Т-клетках. Таким образом, под каждый новый вид клеток, в которых экспрессируют CAR, может потребоваться «адаптация» рецептора и определение доменов, обеспечивающих передачу сигналов от активированного рецептора на необходимом уровне. В случае традиционных CAR-T выбор доменов для включения в состав CAR исследован значительно лучше. Кроме того, некоторые иммунные клетки подвергаются экспансии *ex vivo* с большим трудом, и получение достаточного их количества может потребовать немало времени и средств, что существенно ограничивает возможности получения из них клинически релевантного продукта. Впрочем, в некоторых случаях удается найти альтернативные источники для получения лейкоцитов, которые позволяют по меньшей мере частично решить проблему затрудненной экспансии. Например, CAR-NK-клетки удалось получить из клеточных линий или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [20], а CAR-макрофаги – из моноцитов или iPSC [116]. В то же время такой способ получения клеток может быть связан с потенциальным риском возникновения опухолей из CAR-клеточного продукта в связи с большим онкогенным потенциалом iPSC и, соответственно, требует прицельного изучения с точки зрения безопасности.

Несмотря на существенные ограничения, связанные с созданием CAR-терапии на основе разных типов лейкоцитов, в иммунотерапии солидных опухолей альтернативные CAR-клетки имеют хорошие перспективы. Использование CAR-T в лечении солидных опухолей оказалось в значительной степени неэффективным из-за затрудненной ин-

фильтрации CAR-T-клеток в опухоль, супрессорного влияния опухолевого микроокружения, а также гетерогенности опухолевых антигенов и их частой утраты. Доклинические исследования показали, что многие альтернативные иммунные клетки, экспрессирующие CAR, способны успешно уничтожать солидные опухоли, а некоторые, в частности CAR-M, могут превращать опухолевое микроокружение в воспалительную среду, способствующую элиминации опухоли. Вопрос инфильтрации опухоли иммунными клетками, экспрессирующими CAR, в солидные опухоли также не решен до конца. Возможность эффективного проникновения CAR-клеток в опухоль пока была показана только для NK-клеток и макрофагов [117]. Тем не менее можно предположить, что в комбинации с другими терапевтическими подходами CAR-лейкоциты станут эффективным методом лечения солидных опухолей.

Подводя итог, можно сказать, что CAR-терапия на основе разных типов иммунных клеток уверенно движется в сторону клинического применения. Однако потребуются годы, чтобы альтернативные CAR-клетки стали эффективным, безопасным и широко используемым подходом в терапии онкологических и некоторых других заболеваний.

Вклад авторов. Е.П. Минина и А.В. Боголюбова – концепция обзора; Е.П. Минина – написание текста; С.А. Шитиков – создание иллюстраций; Д.В. Дианов и А.В. Боголюбова – редактирование текста статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuwana, Y., Asakura, Y., Utsunomiya, N., Nakanishi, M., Arata, Y., Itoh, S., Nagase, F., and Kurosawa, Y. (1987) Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **149**, 960-968.
2. Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G., and Schindler, D. G. (1993) Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the γ or ζ subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 720-724, <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.720>.
3. Sadelain, M., Brentjens, R., and Riviere, I. (2013) The basic principles of chimeric antigen receptor design, *Cancer Discov.*, **3**, 388-398, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0548>.
4. Gomes-Silva, D., Mukherjee, M., Srinivasan, M., Krenciute, G., Dakhova, O., Zheng, Y., Cabral, J. M. S., Rooney, C. M., Orange, J. S., Brenner, M. K., and Mamonkin, M. (2017) Tonic 4-1BB costimulation in chimeric antigen receptors impedes T cell survival and is vector-dependent, *Cell Rep.*, **21**, 17-26, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.015>.
5. Maher, J., Brentjens, R. J., Gunset, G., Riviere, I., and Sadelain, M. (2002) Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR ζ /CD28 receptor, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 70-75, <https://doi.org/10.1038/nbt0102-70>.

6. Brentjens, R. J., Latouche, J. B., Santos, E., Marti, F., Gong, M. C., Lyddane, C., King, P. D., Larson, S., Weiss, M., Riviere, I., and Sadelain, M. (2003) Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15, *Nat. Med.*, **9**, 279-286, <https://doi.org/10.1038/nm827>.
7. Список препаратов клеточной и генной терапии, одобренных FDA, URL: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products>.
8. Morgan, R. A., Yang, J. C., Kitano, M., Dudley, M. E., Laurencot, C. M., and Rosenberg, S. A. (2010) Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2, *Mol. Ther.*, **18**, 843-851, <https://doi.org/10.1038/mt.2010.24>.
9. D'Aloia, M. M., Zizzari, I. G., Sacchetti, B., Pierelli, L., and Alimandi, M. (2018) CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors, *Cell Death Dis.*, **9**, 282, <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0278-6>.
10. Larson, R. C., and Maus, M. V. (2021) Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells, *Nat. Rev. Cancer*, **21**, 145-161, <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00323-z>.
11. 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., Kaplan, R. N., Patterson, G. H., Fry, T. J., Orentas, R. J., and Mackall, C. L. (2015) 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors, *Nat. Med.*, **21**, 581-590, <https://doi.org/10.1038/nm.3838>.
12. Hong, M., Clubb, J. D., and Chen, Y. Y. (2020) Engineering CAR-T cells for next-generation cancer therapy, *Cancer Cell*, **38**, 473-488, <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.07.005>.
13. Rafiq, S., Hackett, C. S., and Brentjens, R. J. (2020) Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **17**, 147-167, <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0297-y>.
14. Meza Guzman, L. G., Keating, N., and Nicholson, S. E. (2020) Natural killer cells: tumor surveillance and signaling, *Cancers (Basel)*, **12**, <https://doi.org/10.3390/cancers12040952>.
15. Kumar, S. (2018) Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors, *Immunology*, **154**, 383-393, <https://doi.org/10.1111/imm.12921>.
16. Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H. G., and Bryceson, Y. T. (2010) Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition, *Blood*, **115**, 2167-2176, <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-238469>.
17. Lo Nigro, C., Macagno, M., Sangiolo, D., Bertolaccini, L., Aglietta, M., and Merlano, M. C. (2019) NK-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in solid tumors: biological evidence and clinical perspectives, *Ann. Transl. Med.*, **7**, 105, <https://doi.org/10.21037/atm.2019.01.42>.
18. Тыщук Е. В., Михайлова В. А., Сельков С. А., Соколов Д. И. (2021). Естественные киллеры: происхождение, фенотип, функции, *Медицинская иммунология*, **23**, 1207-1228, <https://doi.org/10.15789/1563-0625-NKC-2330>.
19. Xu, Y., Liu, Q., Zhong, M., Wang, Z., Chen, Z., Zhang, Y., Xing, H., Tian, Z., Tang, K., Liao, X., Rao, Q., Wang, M., and Wang, J. (2019) 2B4 costimulatory domain enhancing cytotoxic ability of anti-CD5 chimeric antigen receptor engineered natural killer cells against T cell malignancies, *J. Hematol. Oncol.*, **12**, 49, <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0732-7>.
20. Xie, G., Dong, H., Liang, Y., Ham, J. D., Rizwan, R., and Chen, J. (2020) CAR-NK cells: a promising cellular immunotherapy for cancer, *EBioMed.*, **59**, 102975, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102975>.
21. Töpfer, K., Cartellieri, M., Michen, S., Wiedemuth, R., Muller, N., Lindemann, D., Bachmann, M., Fussel, M., Schackert, G., and Temme, A. (2015) DAP12-based activating chimeric antigen receptor for NK cell tumor immunotherapy, *J. Immunol.*, **194**, 3201-3212, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400330>.
22. Cifaldi, L., Melaiu, O., Giovannoni, R., Benvenuto, M., Focaccetti, C., Nardozi, D., Barillari, G., and Bei, R. (2023) DNAM-1 chimeric receptor-engineered NK cells: a new frontier for CAR-NK cell-based immunotherapy, *Front. Immunol.*, **14**, 1197053, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1197053>.
23. Oei, V. Y. S., Siernicka, M., Graczyk-Jarzynka, A., Hoel, H. J., Yang, W., Palacios, D., Almasbak, H., Bajor, M., Clement, D., Brandt, L., Onfelt, B., Goodridge, J., Winiarska, M., Zagodzón, R., Olweus, J., Kyte, J. A., and Malmberg, K. J. (2018) Intrinsic functional potential of NK-cell subsets constrains retargeting driven by chimeric antigen receptors, *Cancer Immunol. Res.*, **6**, 467-480, <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0207>.
24. Xia, J., Minamino, S., and Kuwabara, K. (2020) CAR-expressing NK cells for cancer therapy: a new hope, *Biosci. Trends*, **14**, 354-359, <https://doi.org/10.5582/bst.2020.03308>.
25. Dong, H., Ham, J. D., Hu, G., Xie, G., Vergara, J., Liang, Y., Ali, A., Tarannum, M., Donner, H., Baginska, J., Abdulhamid, Y., Dinh, K., Soiffer, R. J., Ritz, J., Glimcher, L. H., Chen, J., and Romee, R. (2022) Memory-like NK cells armed with a neoepitope-specific CAR exhibit potent activity against NPM1 mutated acute myeloid leukemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2122379119, <https://doi.org/10.1073/pnas.2122379119>.
26. Kłopotowska, M., Bajor, M., Graczyk-Jarzynka, A., Kraft, A., Pilch, Z., Zhylyko, A., Firczuk, M., Baranowska, I., Łazniewski, M., Plewczynski, D., Goral, A., Soroczynska, K., Domagała, J., Marhelava, K., Ślusarczyk, A., Retecki, K., Ramji, K., Krawczyk, M., Temples, M. N., Sharma, B., Lachota, M., Netskar, H., Malmberg, K.-J., Zagodzón, R., and Winiarska, M. (2022) PRDX-1 supports the survival and antitumor activity of primary and CAR-modified NK cells under oxidative stress, *Cancer Immunol. Res.*, **10**, 228-244, <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-20-1023>.

27. Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M. F., and Velardi, A. (2002) Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants, *Science*, **295**, 2097-2100, <https://doi.org/10.1126/science.1068440>.
28. Miller, J. S., Soignier, Y., Panoskaltsis-Mortari, A., McNearney, S. A., Yun, G. H., Fautsch, S. K., McKenna, D., Le, C., Defor, T. E., Burns, L. J., Orchard, P. J., Blazar, B. R., Wagner, J. E., Slungaard, A., Weisdorf, D. J., Okazaki, I. J., and McGlave, P. B. (2005) Successful adoptive transfer and *in vivo* expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer, *Blood*, **105**, 3051-3057, <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2974>.
29. Liu, E., Marin, D., Banerjee, P., Macapinlac, H. A., Thompson, P., Basar, R., Nassif Kerbauy, L., Overman, B., Thall, P., Kaplan, M., Nandivada, V., Kaur, I., Nunez Cortes, A., Cao, K., Daher, M., Hosing, C., Cohen, E. N., Kebriaei, P., Mehta, R., Neelapu, S., Nieto, Y., Wang, M., Wierda, W., Keating, M., Champlin, R., Shpall, E., and Rezvani, K. (2020) Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors, *N. Engl. J. Med.*, **382**, 545-553, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910607>.
30. Xiao, L., Cen, D., Gan, H., Sun, Y., Huang, N., Xiong, H., Jin, Q., Su, L., Liu, X., Wang, K., Yan, G., Dong, T., Wu, S., Zhou, P., Zhang, J., Liang, W., Ren, J., Teng, Y., Chen, C., and Xu, X. H. (2019) Adoptive transfer of NKG2D CAR mRNA-engineered natural killer cells in colorectal cancer patients, *Mol. Ther.*, **27**, 1114-1125, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.03.011>.
31. Wrona, E., Borowiec, M., and Potemski, P. (2021) CAR-NK cells in the treatment of solid tumors, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, <https://doi.org/10.3390/ijms22115899>.
32. Ng, Y. Y., Du, Z., Zhang, X., Chng, W. J., and Wang, S. (2022) CXCR4 and anti-BCMA CAR co-modified natural killer cells suppress multiple myeloma progression in a xenograft mouse model, *Cancer Gene Ther.*, **29**, 475-483, <https://doi.org/10.1038/s41417-021-00365-x>.
33. Qin, V. M., D'Souza, C., Neeson, P. J., and Zhu, J. J. (2021) Chimeric antigen receptor beyond CAR-T cells, *Cancers (Basel)*, **13**, <https://doi.org/10.3390/cancers13030404>.
34. Melenhorst, J. J., Chen, G. M., Wang, M., Porter, D. L., Chen, C., Collins, M. A., Gao, P., Bandyopadhyay, S., Sun, H., Zhao, Z., Lundh, S., Pruteanu-Malinici, I., Nobles, C. L., Maji, S., Frey, N. V., Gill, S. I., Loren, A. W., Tian, L., Kulikovskaya, I., Gupta, M., Ambrose, D. E., Davis, M. M., Fraietta, J. A., Brogdon, J. L., Young, R. M., Chew, A., Levine, B. L., Siegel, D. L., Alanio, C., Wherry, E. J., Bushman, F. D., Lacey, S. F., Tan, K., and June, C. H. (2022) Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4⁺ CAR T cells, *Nature*, **602**, 503-509, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04390-6>.
35. Sabbah, M., Jondreville, L., Lacan, C., Norol, F., Vieillard, V., Roos-Weil, D., and Nguyen, S. (2022) CAR-NK cells: a chimeric hope or a promising therapy? *Cancers (Basel)*, **14**, <https://doi.org/10.3390/cancers14153839>.
36. Ebrahimiyan, H., Tamimi, A., Shokoohian, B., Minaei, N., Memarnejadian, A., Hossein-Khannazer, N., Hassan, M., and Vosough, M. (2022) Novel insights in CAR-NK cells beyond CAR-T cell technology; promising advantages, *Int. Immunopharmacol.*, **106**, 108587, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108587>.
37. Daher, M., Basar, R., Gokdemir, E., Baran, N., Upreti, N., Nunez Cortes, A. K., Mendt, M., Kerbauy, L. N., Banerjee, P. P., Shanley M., Imahashi, N., Li, L., Lim, F. L. W. I., Fathi, M., Rezvan, A., Mohanty, V., Shen, Y., Shaim, H., Lu, J., Ozcan, G., Ensley, E., Kaplan, M., Nandivada, V., Bdiwi, M., Acharya, S., Xi, Y., Wan, X., Mak, D., Liu, E., Jiang, X. R., Ang, S., Muniz-Feliciano, L., Li, Y., Wang, J., Kordasti, S., Petrov, N., Varadarajan, N., Marin, D., Brunetti, L., Skinner, R. J., Lyu, S., Silva, L., Turk, R., Schubert, M. S., Rettig, G. R., McNeill, M. S., Kurgan, G., M Behlke, M. A., Li, H., Fowlkes, N. W., Chen, K., Konopleva, M., Champlin, R. E., Shpall, E. J., and Rezvani, K. (2021) Targeting a cytokine checkpoint enhances the fitness of armored cord blood CAR-NK cells, *Blood*, **137**, 624-636, <https://doi.org/10.1182/blood.2020007748>.
38. Pulè, M. A., Straathof, K. C., Dotti, G., Heslop, H. E., Rooney, C. M., and Brenner, M. K. (2005) A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells, *Mol. Ther.*, **12**, 933-941, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.04.016>.
39. Li, Y., Basar, R., Wang, G., Liu, E., Moyes, J. S., Li, L., Kerbauy, L. N., Upreti, N., Fathi, M., Rezvan, A., Banerjee, P. P., Muniz-Feliciano, L., Laskowski, T. J., Ensley, E., Daher, M., Shanley, M., Mendt, M., Acharya, S., Liu, B., Biedersadt, A., Rafei, H., Guo, X., Garcia, L. M., Lin P., Ang, S., Marin, D., Chen, K., Bover, L., Champlin, R. E., Varadarajan, N., Shpall, E. J., and Rezvani, K. (2022) KIR-based inhibitory CARs overcome CAR-NK cell trogocytosis-mediated fratricide and tumor escape, *Nat. Med.*, **28**, 2133-2144, <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02003-x>.
40. Li, L., Mohanty, V., Dou, J., Huang, Y., Banerjee, P. P., Miao, Q., Lohr, J. G., Vijaykumar, T., Frede, J., Knoechel, B., Muniz-Feliciano, L., Laskowski, T. J., Liang, S., Moyes, J. S., Nandivada, V., Basar, R., Kaplan, M., Daher, M., Liu, E., Li, Y., Acharya, S., Lin, P., Shanley, M., Rafei, H., Marin, D., Mielke, S., Champlin, R. E., Shpall, E. J., Chen, K., and Rezvani, K. (2023) Loss of metabolic fitness drives tumor resistance after CAR-NK cell therapy and can be overcome by cytokine engineering, *Sci. Adv.*, **9**, eadd6997, <https://doi.org/10.1126/sciadv.add6997>.
41. Papadopoulou, M., Sanchez Sanchez, G., and Vermijlen, D. (2020) Innate and adaptive $\gamma\delta$ T cells: how, when, and why, *Immunol. Rev.*, **298**, 99-116, <https://doi.org/10.1111/imr.12926>.

42. Simões, A. E., Di Lorenzo, B., and Silva-Santos, B. (2018) Molecular determinants of Target cell recognition by human $\gamma\delta$ T cells, *Front. Immunol.*, **9**, 929, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00929>.
43. Chien, Y. H., Meyer, C., and Bonneville, M. (2014) $\gamma\delta$ T cells: first line of defense and beyond, *Annu. Rev. Immunol.*, **32**, 121-155, <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120216>.
44. Deng, J., and Yin, H. (2022) Gamma delta ($\gamma\delta$) T cells in cancer immunotherapy; where it comes from, where it will go? *Eur. J. Pharmacol.*, **919**, 174803, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174803>.
45. Sebestyen, Z., Prinz, I., Dechanet-Merville, J., Silva-Santos, B., and Kuball, J. (2020) Translating gammadelta ($\gamma\delta$) T cells and their receptors into cancer cell therapies, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **19**, 169-184, <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0038-z>.
46. Girardi, M., Oppenheim, D. E., Steele, C. R., Lewis, J. M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R. E., and Hayday, A. C. (2001) Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells, *Science*, **294**, 605-609, <https://doi.org/10.1126/science.1063916>.
47. Donia, M., Ellebaek, E., Andersen, M. H., Straten, P. T., and Svane, I. M. (2012) Analysis of Vdelta1 T cells in clinical grade melanoma-infiltrating lymphocytes, *Oncoimmunology*, **1**, 1297-1304, <https://doi.org/10.4161/onci.21659>.
48. Wang, J., Lin, C., Li, H., Li, R., Wu, Y., Liu, H., Zhang, H., He, H., Zhang, W., and Xu, J. (2017) Tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells predict prognosis and adjuvant chemotherapeutic benefit in patients with gastric cancer, *Oncoimmunology*, **6**, e1353858, <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1353858>.
49. Silva-Santos, B., Mensurado, S., and Coffelt, S. B. (2019) $\gamma\delta$ T cells: pleiotropic immune effectors with therapeutic potential in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **19**, 392-404, <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0153-5>.
50. Gunderson, A. J., Kaneda, M. M., Tsujikawa, T., Nguyen, A. V., Affara, N. I., Ruffell, B., Gorjestani, S., Liudahl, S. M., Truitt, M., Olson, P., Kim, G., Hanahan, D., Tempero, M. A., Sheppard, B., Irving, B., Chang, B. Y., Varner, J. A., and Coussens, L. M. (2016) Bruton tyrosine kinase-dependent immune cell cross-talk drives pancreas cancer, *Cancer Discov.*, **6**, 270-285, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0827>.
51. Deniger, D. C., Switzer, K., Mi, T., Maiti, S., Hurton, L., Singh, H., Huls, H., Olivares, S., Lee, D. A., Champlin, R. E., and Cooper, L. J. (2013) Bispecific T-cells expressing polyclonal repertoire of endogenous $\gamma\delta$ T-cell receptors and introduced CD19-specific chimeric antigen receptor, *Mol. Ther.*, **21**, 638-647, <https://doi.org/10.1038/mt.2012.267>.
52. Rozenbaum, M., Meir, A., Aharoni, Y., Itzhaki, O., Schachter, J., Bank, I., Jacoby, E., and Besser, M. J. (2020) Gamma-delta CAR-T cells show CAR-directed and independent activity against leukemia, *Front. Immunol.*, **11**, 1347, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01347>.
53. Fisher, J., Abramowski, P., Wisidagamage Don, N. D., Flutter, B., Capsomidis, A., Cheung, G. W., Gustafsson, K., and Anderson, J. (2017) Avoidance of on-target off-tumor activation using a co-stimulation-only chimeric antigen receptor, *Mol. Ther.*, **25**, 1234-1247, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.002>.
54. Morandi, F., Yazdanifar, M., Cocco, C., Bertaina, A., and Airolidi, I. (2020) Engineering the bridge between innate and adaptive immunity for cancer immunotherapy: focus on $\gamma\delta$ T and NK cells, *Cells*, **9**, <https://doi.org/10.3390/cells9081757>.
55. Fleischer, L. C., Becker, S. A., Ryan, R. E., Fedanov, A., Doering, C. B., and Spencer, H. T. (2020) Non-signaling chimeric antigen receptors enhance antigen-directed killing by $\gamma\delta$ T cells in contrast to $\alpha\beta$ T cells, *Mol. Ther. Oncolytics*, **18**, 149-160, <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.06.003>.
56. Ali, A. K., Tarannum, M., and Romee, R. (2021) Is adoptive cellular therapy with non-T-cell immune effectors the future? *Cancer J.*, **27**, 168-175, <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000517>.
57. Vivier, E., and Anfossi, N. (2004) Inhibitory NK-cell receptors on T cells: witness of the past, actors of the future, *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 190-198, <https://doi.org/10.1038/nri1306>.
58. Kriegsmann, K., Kriegsmann, M., von Bergwelt-Baildon, M., Cremer, M., and Witzens-Harig, M. (2018) NKT cells – new players in CAR cell immunotherapy? *Eur. J. Haematol.*, **101**, 750-757, <https://doi.org/10.1111/ejh.13170>.
59. Yoneda, K., Morii, T., Nieda, M., Tsukaguchi, N., Amano, I., Tanaka, H., Yagi, H., Narita, N., and Kimura, H. (2005) The peripheral blood Valpha24⁺ NKT cell numbers decrease in patients with haematopoietic malignancy, *Leuk. Res.*, **29**, 147-152, <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2004.06.005>.
60. Tahir, S. M., Cheng, O., Shaulov, A., Koezuka, Y., Bubley, G. J., Wilson, S. B., Balk, S. P., and Exley, M. A. (2001) Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer, *J. Immunol.*, **167**, 4046-4050, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.7.4046>.
61. Tachibana, T., Onodera, H., Tsuruyama, T., Mori, A., Nagayama, S., Hiai, H., and Imamura, M. (2005) Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas, *Clin. Cancer Res.*, **11**, 7322-7327, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0877>.
62. Schneiders F. L., de Bruin, R. C., van den Eertwegh, A. J., Scheper, R. J., Leemans, C. R., Brakenhoff, R. H., Langendijk, J. A., Verheul, H. M., de Gruijl, T. D., Molling, J. W., and van der Vliet, H. J. (2012) Circulating invariant natural killer T-cell numbers predict outcome in head and neck squamous cell carcinoma: updated analysis with 10-year follow-up, *J. Clin. Oncol.*, **30**, 565-567, <https://doi.org/10.1200/jco.2011.39.3975>.

63. Bassiri, H., Das, R., Guan, P., Barrett, D. M., Brennan, P. J., Banerjee, P. P., Wiener, S. J., Orange, J. S., Brenner, M. B., Grupp, S. A., and Nichols, K. E. (2014) iNKT cell cytotoxic responses control T-lymphoma growth *in vitro* and *in vivo*, *Cancer Immunol. Res.*, **2**, 59-69, <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0104>.
64. Nair, S., and Dhodapkar, M. V. (2017) Natural killer T cells in cancer immunotherapy, *Front. Immunol.*, **8**, 1178, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01178>.
65. McEwen-Smith, R. M., Salio, M., and Cerundolo, V. (2015) The regulatory role of invariant NKT cells in tumor immunity, *Cancer Immunol. Res.*, **3**, 425-435, <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0062>.
66. Cortés-Selva, D., Dasgupta, B., Singh, S., and Grewal, I. S. (2021) Innate and innate-like cells: the future of chimeric antigen receptor (CAR) cell therapy, *Trends Pharmacol. Sci.*, **42**, 45-59, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.11.004>.
67. Heczey, A., Liu, D., Tian, G., Courtney, A. N., Wei, J., Marinova, E., Gao, X., Guo, L., Yvon, E., Hicks, J., Liu, H., Dotti, G., and Metelitsa, L. S. (2014) Invariant NKT cells with chimeric antigen receptor provide a novel platform for safe and effective cancer immunotherapy, *Blood*, **124**, 2824-2833, <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-541235>.
68. Tian, G., Courtney, A. N., Jena, B., Heczey, A., Liu, D., Marinova, E., Guo, L., Xu, X., Torikai, H., Mo, Q., Dotti, G., Cooper, L. J., and Metelitsa, L. S. (2016) CD62L⁺ NKT cells have prolonged persistence and antitumor activity *in vivo*, *J. Clin. Invest.*, **126**, 2341-2355, <https://doi.org/10.1172/JCI83476>.
69. Simon, B., Wiesinger, M., Marz, J., Wistuba-Hamprecht, K., Weide, B., Schuler-Thurner, B., Schuler, G., Dorrie, J., and Uslu, U. (2018) The generation of CAR-transfected natural killer T cells for the immunotherapy of melanoma, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 2365, <https://doi.org/10.3390/ijms19082365>.
70. Shaik, R. S., Rath, P., Courtney, A., Schneller, N., Guo, L., Barragan, G., Zhang, C., Xu, X., Sumazin, P., Metelitsa, L., and Heczey, A. (2022) Glypican-3-specific CAR-NKT cells overexpressing BATF3 mediate potent antitumor activity against hepatocellular carcinoma, *J. Clin. Oncol.*, **40**, e14521-e14521, https://doi.org/10.1200/jco.2022.40.16_suppl.e14521.
71. Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., and Sakaguchi, S. (1999) Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance, *J. Immunol.*, **162**, 5317-5326.
72. Romano, M., Fanelli, G., Albany, C. J., Giganti, G., and Lombardi, G. (2019) Past, Present, and future of regulatory T cell therapy in transplantation and autoimmunity, *Front. Immunol.*, **10**, 43, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00043>.
73. Arjomandnejad, M., Kopec, A. L., and Keeler, A. M. (2022) CAR-T regulatory (CAR-Treg) cells: engineering and applications, *Biomedicines*, **10**, 287, <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020287>.
74. Elinav, E., Waks, T., and Eshhar, Z. (2008) Redirection of regulatory T cells with predetermined specificity for the treatment of experimental colitis in mice, *Gastroenterology*, **134**, 2014-2024, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.02.060>.
75. Hombach, A. A., Kofler, D., Rappl, G., and Abken, H. (2009) Redirecting human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from the peripheral blood with pre-defined target specificity, *Gene Ther.*, **16**, 1088-1096, <https://doi.org/10.1038/gt.2009.75>.
76. Dawson, N. A. J., Rosado-Sánchez, I., Novakovsky, G. E., Fung, V. C. W., Huang, Q., McIver, E., Sun, G., Gillies, J., Speck, M., Orban, P. C., Mojibian, M., and Levings, M. K. (2020) Functional effects of chimeric antigen receptor co-receptor signaling domains in human regulatory T cells, *Sci. Transl. Med.*, **12**, eaaz3866, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaz3866>.
77. Mohseni, Y. R., Saleem, A., Tung, S. L., Dudreuilh, C., Lang, C., Peng, Q., Volpe, A., Adigbli, G., Cross, A., Hester, J., Farzaneh, F., Scotta, C., Lechler, R. I., Issa, F., Fruhwirth, G. O., and Lombardi, G. (2021) Chimeric antigen receptor-modified human regulatory T cells that constitutively express IL-10 maintain their phenotype and are potently suppressive, *Eur. J. Immunol.*, **51**, 2522-2530, <https://doi.org/10.1002/eji.202048934>.
78. Boroughs, A. C., Larson, R. C., Choi, B. D., Bouffard, A. A., Riley, L. S., Schiferle, E., Kulkarni, A. S., Cetrulo, C. L., Ting, D., Blazar, B. R., Demehri, S., and Maus, M. V. (2019) Chimeric antigen receptor costimulation domains modulate human regulatory T cell function, *JCI Insight*, **5**, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126194>.
79. Fu, R. Y., Chen, A. C., Lyle, M. J., Chen, C. Y., Liu, C. L., and Miao, C. H. (2020) CD4⁺ T cells engineered with FVIII-CAR and murine Foxp3 suppress anti-factor VIII immune responses in hemophilia a mice, *Cell Immunol.*, **358**, 104216, <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104216>.
80. Arjomandnejad, M., Sylvia, K., Blackwood, M., Nixon, T., Tang, Q., Muhuri, M., Gruntman, A. M., Gao, G., Flotte, T. R., and Keeler, A. M. (2021) Modulating immune responses to AAV by expanded polyclonal T-regs and capsid specific chimeric antigen receptor T-regulatory cells, *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, **23**, 490-506, <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.10.010>.
81. Rana, J., and Biswas, M. (2020) Regulatory T cell therapy: current and future design perspectives, *Cell Immunol.*, **356**, 104193, <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104193>.

82. MacDonald, K. G., Hoeppli, R. E., Huang, Q., Gillies, J., Luciani, D. S., Orban, P. C., Broady, R., and Levings, M. K. (2016) Alloantigen-specific regulatory T cells generated with a chimeric antigen receptor, *J. Clin. Invest.*, **126**, 1413-1424, <https://doi.org/10.1172/JCI82771>.
83. D'Souza, C., Chen, Z., and Corbett, A. J. (2018) Revealing the protective and pathogenic potential of MAIT cells, *Mol. Immunol.*, **103**, 46-54, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.08.022>.
84. Howson, L. J., Salio, M., and Cerundolo, V. (2015) MR1-restricted mucosal-associated invariant T cells and their activation during infectious diseases, *Front. Immunol.*, **6**, 303, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00303>.
85. Le Bourhis, L., Dusseaux, M., Bohineust, A., Bessoles, S., Martin, E., Premel, V., Core, M., Sleurs, D., Serriari, N. E., Treiner, E., Hivroz, C., Sansonetti, P., Gougeon, M. L., Soudais, C., and Lantz, O. (2013) MAIT cells detect and efficiently lyse bacterially-infected epithelial cells, *PLoS Pathog.*, **9**, e1003681, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003681>.
86. Dogan, M., Karhan, E., Kozhaya, L., Placek, L., Chen, X., Yigit, M., and Unutmaz, D. (2022) Engineering human mucosal associated invariant T (MAIT) cells with chimeric antigen receptors for cancer immunotherapy, *J. Immunol.*, **209**, 1523-1531, <https://doi.org/10.1101/2022.07.28.501764>.
87. Won, E. J., Ju, J. K., Cho, Y. N., Jin, H. M., Park, K. J., Kim, T. J., Kwon, Y.-S., Kee, H. J., Kim, J. C., Kee, S.-J., and Park, Y.-W. (2016) Clinical relevance of circulating mucosal-associated invariant T cell levels and their anti-cancer activity in patients with mucosal-associated cancer, *Oncotarget*, **7**, 76274-76290, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11187>.
88. Gherardin, N. A., Loh, L., Admojo, L., Davenport, A. J., Richardson, K., Rogers, A., Darcy, P. K., Jenkins, M. R., Prince, H. M., Harrison, S. J., Quach, H., Fairlie, D. P., Kedzierska, K., McCluskey, J., Uldrich, A. P., Neeson, P. J., Ritchie, D. S., and Godfrey, D. I. (2018) Enumeration, functional responses and cytotoxic capacity of MAIT cells in newly diagnosed and relapsed multiple myeloma, *Sci. Rep.*, **8**, 4159, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22130-1>.
89. Reantragoon, R., Boonpattanaporn, N., Corbett, A. J., and McCluskey, J. (2016) Mucosal-associated invariant T cells in clinical diseases, *As. Pac. J. Allergy Immunol.*, **34**, 3-10.
90. Zhang, Z.-X., Yang, L., Young, K. J., Dutemple, B., and Zhang, L. I. (2000) Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression, *Nat. Med.*, **6**, 782-789, <https://doi.org/10.1038/77513>.
91. Wu, Z., Zheng, Y., Sheng, J., Han, Y., Yang, Y., Pan, H., and Yao, J. (2022) CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (Double-Negative) T cells in inflammation, immune disorders and cancer, *Front. Immunol.*, **13**, 816005, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.816005>.
92. Zhang, Z.-X., Yang, L., Young, K. J., and Zhang, L. (2001) Suppression of alloimmune responses *in vitro* and *in vivo* by CD3 CD8 CD4 regulatory T cells, *Transplant. Proc.*, **33**, 84-85, [https://doi.org/10.1016/s0041-1345\(00\)01915-1](https://doi.org/10.1016/s0041-1345(00)01915-1).
93. Young, K. J., DuTemple, B., Phillips, M. J., and Zhang, L. (2003) Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells, *J. Immunol.*, **171**, 134-141, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.1.134>.
94. Chen, W., Ford, M. S., Young, K. J., Cybulsky, M. I., and Zhang, L. (2003) Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival, *J. Immunol.*, **170**, 1846-1853, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.4.1846>.
95. Chen, J., Hu, P., Wu, G., and Zhou, H. (2019) Antipancreatic cancer effect of DNT cells and the underlying mechanism, *Pancreatol.*, **19**, 105-113, <https://doi.org/10.1016/j.pan.2018.12.006>.
96. Chen, X., Wang, D., and Zhu, X. (2022) Application of double-negative T cells in haematological malignancies: recent progress and future directions, *Biomark. Res.*, **10**, 11, <https://doi.org/10.1186/s40364-022-00360-w>.
97. Merims, S., Li, X., Joe, B., Dokouhaki, P., Han, M., Childs, R. W., Wang, Z. Y., Gupta, V., Minden, M. D., and Zhang, L. (2011) Anti-leukemia effect of *ex vivo* expanded DNT cells from AML patients: a potential novel autologous T-cell adoptive immunotherapy, *Leukemia*, **25**, 1415-1422, <https://doi.org/10.1038/leu.2011.99>.
98. Lee, J. B., Kang, H., Fang, L., D'Souza, C., Adeyi, O., and Zhang, L. (2019) Developing allogeneic double-negative T cells as a novel off-the-shelf adoptive cellular therapy for cancer, *Clin. Cancer Res.*, **25**, 2241-2253, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2291>.
99. Vasic, D., Lee, J. B., Leung, Y., Khatri, I., Na, Y., Abate-Daga, D., and Zhang, L. (2022) Allogeneic double-negative CAR-T cells inhibit tumor growth without off-tumor toxicities, *Sci. Immunol.*, **7**, eabl3642, <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abl3642>.
100. Gao, X., Mi, Y., Guo, N., Xu, H., Xu, L., Gou, X., and Jin, W. (2017) Cytokine-induced killer cells as pharmacological tools for cancer immunotherapy, *Front. Immunol.*, **8**, 774, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00774>.
101. Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. Z., and Rosenberg, S. A. (1982) Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **155**, 1823-1841, <https://doi.org/10.1084/jem.155.6.1823>.
102. Rosenberg, S. A., Spiess, P., and Lafreniere, R. (1986) A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes, *Science*, **233**, 1318-1321, <https://doi.org/10.1126/science.3489291>.

103. Cappuzzello, E., Sommaggio, R., Zanovello, P., and Rosato, A. (2017) Cytokines for the induction of antitumor effectors: the paradigm of cytokine-induced killer (CIK) cells, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **36**, 99-105, <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.06.003>.
104. Diefenbach, A., Jamieson, A. M., Liu, S. D., Shastri, N., and Raulet, D. H. (2000) Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages, *Nat. Immunol.*, **1**, 119-126, <https://doi.org/10.1038/77793>.
105. Merker, M., Wagner, J., Kreyenberg, H., Heim, C., Moser, L. M., Wels, W. S., Bonig, H., Ivics, Z., Ullrich, E., Klingebiel, T., Bader, P., and Rettinger, E. (2020) ERBB2-CAR-engineered cytokine-induced killer cells exhibit both CAR-mediated and innate immunity against high-risk rhabdomyosarcoma, *Front. Immunol.*, **11**, 581468, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.581468>.
106. Rotolo, R., Leuci, V., Donini, C., Cykowska, A., Gammaitoni, L., Medico, G., Valabrega, G., Aglietta, M., and Sangiolo, D. (2019) CAR-based strategies beyond T lymphocytes: integrative opportunities for cancer adoptive immunotherapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, <https://doi.org/10.3390/ijms20112839>.
107. Marin, V., Dander, E., Biagi, E., Introna, M., Fazio, G., Biondi, A., and D'Amico, G. (2006) Characterization of *in vitro* migratory properties of anti-CD19 chimeric receptor-redirectioned CIK cells for their potential use in B-ALL immunotherapy, *Exp. Hematol.*, **34**, 1219-1229, <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.05.004>.
108. Marin, V., Kakuda, H., Dander, E., Imai, C., Campana, D., Biondi, A., and D'Amico, G. (2007) Enhancement of the anti-leukemic activity of cytokine induced killer cells with an anti-CD19 chimeric receptor delivering a 4-1BB-zeta activating signal, *Exp. Hematol.*, **35**, 1388-1397, <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2007.05.018>.
109. Marin, V., Pizzitola, I., Agostoni, V., Attianese, G. M., Finney, H., Lawson, A., Pule, M., Rousseau, R., Biondi, A., and Biagi, E. (2010) Cytokine-induced killer cells for cell therapy of acute myeloid leukemia: improvement of their immune activity by expression of CD33-specific chimeric receptors, *Haematologica*, **95**, 2144-2152, <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.026310>.
110. Magnani, C. F., Mezzanotte, C., Cappuzzello, C., Bardini, M., Tettamanti, S., Fazio, G., Cooper, L. J. N., Dastoli, G., Cazzaniga, G., Biondi, A., and Biagi, E. (2018) Preclinical efficacy and safety of CD19CAR cytokine-induced killer cells transfected with sleeping beauty transposon for the treatment of acute lymphoblastic leukemia, *Hum. Gene Ther.*, **29**, 602-613, <https://doi.org/10.1089/hum.2017.207>.
111. Jarosz-Biej, M., Kaminska, N., Matuszczak, S., Cichon, T., Pamula-Pilat, J., Czapl, J., Smolarczyk, R., Skwarzynska, D., Kulik, K., and Szala, S. (2018) M1-like macrophages change tumor blood vessels and microenvironment in murine melanoma, *PLoS One*, **13**, e0191012, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191012>.
112. Biglari, A., Southgate, T. D., Fairbairn, L. J., and Gilham, D. E. (2006) Human monocytes expressing a CEA-specific chimeric CD64 receptor specifically target CEA-expressing tumour cells *in vitro* and *in vivo*, *Gene Ther.*, **13**, 602-610, <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302706>.
113. Morrissey, M. A., Williamson, A. P., Steinbach, A. M., Roberts, E. W., Kern, N., Headley, M. B., and Vale, R. D. (2018) Chimeric antigen receptors that trigger phagocytosis, *Elife*, **7**, <https://doi.org/10.7554/eLife.36688>.
114. Klichinsky, M., Ruella, M., Shestova, O., Lu, X. M., Best, A., Zeeman, M., Schmierer, M., Gabrusiewicz, K., Anderson, N. R., Petty, N. E., Cummins, K. D., Shen, F., Shan, X., Veliz, K., Blouch, K., Yashiro-Ohtani, Y., Kenderian, S. S., Kim, M. Y., O'Connor, R. S., Wallace, S. R., Kozlowski, M. S., Marchione, D. M., Shestov, M., Garcia, B. A., June, C. H., and Gill, S. (2020) Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy, *Nat. Biotechnol.*, **38**, 947-953, <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0462-y>.
115. Cannac, M., Nikolic, J., and Benaroch, P. (2022) Cancer immunotherapies based on genetically engineered macrophages, *Cancer Immunol. Res.*, **10**, 1156-1166, <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-22-0030>.
116. Zhang, L., Tian, L., Dai, X., Yu, H., Wang, J., Lei, A., Zhu, M., Xu, J., Zhao, W., Zhu, Y., Sun, Z., Zhang, H., Hu, Y., Wang, Y., Xu, Y., Church, G. M., Huang, H., Weng, Q., and Zhang, J. (2020) Pluripotent stem cell-derived CAR-macrophage cells with antigen-dependent anti-cancer cell functions, *J. Hematol. Oncol.*, **13**, 153, <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00983-2>.
117. Hagemann, T., Lawrence, T., McNeish, I., Charles, K. A., Kulbe, H., Thompson, R. G., Robinson, S. C., and Balkwill, F. R. (2008) "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB, *J. Exp. Med.*, **205**, 1261-1268, <https://doi.org/10.1084/jem.20080108>.
118. Niu, Z., Chen, G., Chang, W., Sun, P., Luo, Z., Zhang, H., Zhi, L., Guo, C., Chen, H., Yin, M., and Zhu, W. (2021) Chimeric antigen receptor-modified macrophages trigger systemic anti-tumour immunity, *J. Pathol.*, **253**, 247-257, <https://doi.org/10.1002/path.5585>.
119. Zhang, W., Liu, L., Su, H., Liu, Q., Shen, J., Dai, H., Zheng, W., Lu, Y., Zhang, W., Bei, Y., and Shen, P. (2019) Chimeric antigen receptor macrophage therapy for breast tumours mediated by targeting the tumour extracellular matrix, *Br. J. Cancer*, **121**, 837-845, <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0578-3>.
120. Williford, J. M., Ishihara, J., Ishihara, A., Mansurov, A., Hosseinchi, P., Marchell, T. M., Potin, L., Swartz, M. A., and Hubbell, J. A. (2019) Recruitment of CD103⁺ dendritic cells via tumor-targeted chemokine

- delivery enhances efficacy of checkpoint inhibitor immunotherapy, *Sci. Adv.*, **5**, 1-15, <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay1357>.
121. Maier, B., Leader, A. M., Chen, S. T., Tung, N., Chang, C., LeBerichel, J., Chudnovskiy, A., Maskey, S., Walker, L., Finnigan, J. P., Kirkling, M. E., Reizis, B., Ghosh, S., D'Amore, N. R., Bhardwaj, N., Rothlin, C. V., Wolf, A., Flores, R., Marron, T., Rahman, A. H., Kenigsberg, E., Brown, B. D., and Merad, M. (2020) A conserved dendritic-cell regulatory program limits antitumour immunity, *Nature*, **580**, 257-262, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2134-y>.
 122. Hildner, K., Edelson, B. T., Purtha, W. E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B. U., Unanue, E. R., Diamond, M. S., Schreiber, R. D., Murphy, T. L., and Murphy, K. M. (2008) Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8 α^+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity, *Science*, **322**, 1097-1100, <https://doi.org/10.1126/science.1164206>.
 123. Suh, H. C., Pohl, K. A., Termini, C., Kan, J., Timmerman, J. M., Slamon, D. J., and Chute, J. P. (2018) Bioengineered autologous dendritic cells enhance car t cell cytotoxicity by providing cytokine stimulation and intratumoral dendritic cells, *Blood*, **132**, 3693, <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-115296>.
 124. Zhang, L., Morgan, R. A., Beane, J. D., Zheng, Z., Dudley, M. E., Kassim, S. H., Nahvi, A. V., Ngo, L. T., Sherry, R. M., Phan, G. Q., Hughes, M. S., Kammula, U. S., Feldman, S. A., Toomey, M. A., Kerkar, S. P., Restifo, N. P., Yang, J. C., and Rosenberg, S. A. (2015) Tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma, *Clin. Cancer Res.*, **21**, 2278-2288, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2085>.
 125. Ruella, M., Xu, J., Barrett, D. M., Fraietta, J. A., Reich, T. J., Ambrose, D. E., Klichinsky, M., Shestova, O., Patel, P. R., Kulikovskaya, I., Nazimuddin, F., Bhoj, V. G., Orlando, E. J., Fry, T. J., Bitter, H., Maude, S. L., Levine, B. L., Nobles, C. L., Bushman, F. D., Young, R. M., Scholler, J., Gill, S. I., June, C. H., Grupp, S. A., Lacey, S. F., and Melenhorst, J. J. (2018) Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell, *Nat. Med.*, **24**, 1499-1503, <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0201-9>.
 126. Pesch, T., Bonati, L., Kelton, W., Parola, C., Ehling, R. A., Csepregi, L., Kitamura, D., and Reddy, S. T. (2019) Molecular design, optimization, and genomic integration of chimeric B cell receptors in murine B cells, *Front. Immunol.*, **10**, 2630, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02630>.
 127. Neelapu, S. S., Locke, F. L., Bartlett, N. L., Lekakis, L. J., Miklos, D. B., Jacobson, C. A., Braunschweig, I., Oluwole, O. O., Siddiqi, T., Lin, Y., Timmerman, J. M., Stiff, P. J., Friedberg, J. W., Flinn, I. W., Goy, A., Hill, B. T., Smith, M. R., Deol, A., Farooq, U., McSweeney, P., Munoz, J., Avivi, I., Castro, J. E., Westin, J. R., Chavez, J. C., Ghobadi, A., Komanduri, K. V., Levy, R., Jacobsen, E. D., Witzig, T. E., Reagan, P., Bot, A., Rossi, J., Navale, L., Jiang, Y., Aycock, J., Elias, M., Chang, D., Wiecek, J., and Go, W. Y. (2017) Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma, *N. Engl. J. Med.*, **377**, 2531-2544, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707447>.
 128. Schuster, S. J., Svoboda, J., Chong, E. A., Nasta, S. D., Mato, A. R., Anak, O., Brogdon, J. L., Pruteanu-Malinici, I., Bhoj, V., Landsburg, D., Wasik, M., Levine, B. L., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., Porter, D. L., and June, C. H. (2017) Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas, *N. Engl. J. Med.*, **377**, 2545-2554, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1708566>.
 129. Imura, Y., Ando, M., Kondo, T., Ito, M., and Yoshimura, A. (2020) CD19-targeted CAR regulatory T cells suppress B cell pathology without GvHD, *JCI Insight*, **5**, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.136185>.
 130. Raje, N., Berdeja, J., Lin, Y., Siegel, D., Jagannath, S., Madduri, D., Liedtke, M., Rosenblatt, J., Maus, M. V., Turka, A., Lam, L. P., Morgan, R. A., Friedman, K., Massaro, M., Wang, J., Russotti, G., Yang, Z., Campbell, T., Hege, K., Petrocca, F., Quigley, M. T., Munshi, N., and Kochenderfer, J. N. (2019) Anti-BCMA CAR T-cell therapy bb2121 in relapsed or refractory multiple myeloma, *N. Engl. J. Med.*, **380**, 1726-1737, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1817226>.
 131. Berdeja, J. G., Madduri, D., Usmani, S. Z., Jakubowiak, A., Agha, M., Cohen, A. D., Stewart, A. K., Hari, P., Htut, M., Lesokhin, A., Deol, A., Munshi, N. C., O'Donnell, E., Avigan, D., Singh, I., Zudaire, E., Yeh, T. M., Allred, A. J., Olyslager, Y., Banerjee, A., Jackson, C. C., Goldberg, J. D., Schechter, J. M., Deraed, W., Zhuang, S. H., Infante, J., Geng, D., Wu, X., Carrasco-Alfonso, M. J., Akram, M., Hossain, F., Rizvi, S., Fan, F., Lin, Y., Martin, T., and Jagannath, S. (2021) Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study, *Lancet*, **398**, 314-324, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00933-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00933-8).
 132. Wang, X., Jasinski, D. L., Medina, J. L., Spencer, D. M., Foster, A. E., and Bayle, J. H. (2020) Inducible MyD88/CD40 synergizes with IL-15 to enhance antitumor efficacy of CAR-NK cells, *Blood Adv.*, **4**, 1950-1964, <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020001510>.
 133. Shin, M. H., Oh, E., Kim, Y., Nam, D. H., Jeon, S. Y., Yu, J. H., and Minn, D. (2023) Recent advances in CAR-based solid tumor immunotherapy, *Cells*, **12**, 1606, <https://doi.org/10.3390/cells12121606>.

CAR BEYOND THE CLASSICAL CAR-T: FUNCTIONAL FEATURES AND APPLICATION PROSPECTS

Review

E. P. Minina, D. V. Dianov, S. A. Sheetikov, and A. V. Bogolyubova*

*National Research Center for Hematology,
125167 Moscow, Russia; e-mail: apollinariya.bogolyubova@gmail.com*

Chimeric Antigen Receptor (CAR) is a genetically engineered receptor that recognizes an antigen and subsequently activates a signaling cascade in a cell. Antigen recognition and signal transduction are carried out by different CAR domains derived from different proteins; thus, CAR has a mixed domain composition. Cytotoxic T cells expressing CAR recognizing tumor-associated antigens led to development of CAR-T, a novel approach in the therapy of malignant diseases. Despite the high efficacy of CAR-T in hematological malignancies, this approach has several disadvantages that could be overcome by using leucocytes from other groups as effector cells. Currently, many cells of both innate and adaptive immunity have been shown to express CAR, leading to the development or enhancement of their cytotoxic properties. In this review, we discuss the peculiarities of CAR function in different types of immune cells will be covered. In particular, we focus on the results of pre-clinical and clinical research on the efficacy and safety of non-conventional CAR-expressing cells.

Keywords: chimeric antigen receptor, immunotherapy, cell therapy, CAR, CAR-T, CAR-NK