

CAR-T-soluhoido ja keskeiset tieteelliset haasteet sen ulottamiseksi kiinteiden syöpien hoitoon

Mikael Mustonen

Luonnontieteiden kandidaatintutkielma

Turun Yliopisto

Biolääketieteen koulutusohjelma

Lääketieteellinen tiedekunta

Biolääketieteen laitos

22.05.2025

Sisällysluettelo

1. Johdanto	5
2. CAR-T-soluhoido	6
2.1 CAR-rakenne	6
2.1.1 Antigeeniä sitova osa	6
2.1.2 Sarana-rakenne	7
2.1.3 Solukalvon läpäisevä osa (TM-domeeni)	8
2.1.4 Solunsisäinen domeeni	8
2.2 CAR-T-soluhoido nykypäivän kliinisessä työssä	10
3. CAR-T soluhoidon keskeiset haasteet kiinteiden syöpien hoidossa	10
3.1 CAR-T-solujen navigointi, toiminta ja säilyvyys kasvainympäristössä	10
3.1.1 CAR-T-solujen soluliikenne ja syöpäkudokseen tunkeutuminen	11
3.1.2 Immunosuppressiivinen mikroympäristö	12
3.2 On-target off-tumour-ilmio	14
3.3 Haittavaikutukset	15
4. Strategioita CAR-T-soluhoidon kiinteiden syöpien haasteiden ratkaisemiseksi	16
4.1 CAR-T-solujen kulkeutumisen tehostaminen, säilyvyyden parantaminen ja uupumisen ehkäisy kasvainmikroympäristössä	16
4.2 Strategioita on-target off-tumour-ilmion voittamiseksi	18
4.3 Farmakologinen lääkehoito CAR-T-hoidon tueksi ja haittavaikutusten estämiseksi	22
5. Yhteenveto ja johtopäätökset	23
Lähdeluettelo	25

Oppiaine: Biolääketieteen koulutusohjelma

Tekijä: Mikael Mustonen

Otiskko: CAR-T-soluhoido ja keskeiset tieteelliset haasteet sen ulottamiseksi kiinteiden syöpien hoitoon

Ohjaajat: LT, Virologian Prof. Kalle Saksela ja FT, Biotekniikan Prof. Urpo Lamminmäki

Sivumäärä: 24

Päivämäärä: 22.05.2025

Tiivistelmä

Syöpä on ollut pitkään yksi yleisimmistä kuolemaan johtaneista sairauksista. Vuonna 2022 syöpään menehtyi 9,7 miljoonaa ihmistä. Kiinteiden syöpien hoidoissa kirurgiset toimenpiteet ja sädehoito ovat tehokkaita varhaisvaiheen hoitomuotoja, mutta levinneen syövän kohdalla kasvainta on kirurgisesti vaikea kokonaan poistaa. Näiden haasteiden vuoksi kehitetään jatkuvasti uusia hoitomuotoja, joista lupaavimpien joukossa ovat immunoterapeuttiset hoitomuodot, kuten CAR-T-soluhoido.

Perinteisesti CAR-T-hoido perustuu potilaan omien T-solujen muokkaamiseen siten, että ne pystyvät tunnistamaan ja tuhoamaan hematologisia syöpäsoluja täsmällisesti. Hoidossa kerätään potilaan omia T-soluja, joita muokataan geneettisesti ilmentämään kimeeristä antigeeniä sitovaa reseptoria (CAR). CAR-rakennetta muokataan tunnistamaan syövälle ominaista pintaproteiinia, ja tunnistessaan syöpäsolun CAR-T-solu aktivoituu ja tuhoaa sen.

Tähän mennessä kuusi CAR-T-soluhoidoa on saanut USA:n Elintarvike ja lääkeviraston (FDA) hyväksynnän B-solulähtöisten hematologisten syöpien hoitoon, ja niistä on tullut keskeinen hoitovaihtoehto muille hoidoille resistentille potilaille. Hoidon tehokkuus perustuu B-soluille ominaisiin ja helposti kohdennettaviin pintaproteiineihin, kuten erilaistumisklusteri 19 (CD19) -proteiiniin. CAR-T-solut muokataan tunnistamaan näitä pintaproteiineja, jolloin ne tuhoavat vain B-soluja ja jättävät muut kudokset rauhaan.

Hematologisten syöpien merkittävien saavutusten lisäksi CAR-T-hoitoja on yritetty soveltaa myös kiinteiden syöpien hoitoon. Tämä on kuitenkin osoittautunut haastavaksi, sillä toisin kuin verisyövässä, kiinteiden syöpäsolujen pinnalla ei yleensä esiinny syövälle ominaisia kohdennettavia pintarakenteita. Kiinteiden syöpien kohdistamiseen soveltuvia pintarakenteita esiintyy usein myös terveissä soluissa, vaikkakin pienemmissä määrin. Kun CAR-T-soluja kohdennetaan näihin pintarakenteisiin, ne voivat aiheuttaa myös terveiden kudoksien tuhoutumista ja vakavia haittavaikutuksia. Lisäksi kiinteiden syöpien heterogeenisyys, niiden nopea sopeutuminen hoitoihin ja haastava kasvainmikroympäristö ovat tuottaneet huomattavia haasteita CAR-T-hoidoille.

Näiden haasteiden voittamiseksi on kehitetty useita eri strategioita. Tutkimuksissa on keskitytty muun muassa CAR-rakenteen optimointiin, kasvainmikroympäristön muokkaamiseen CAR-T-soluille suotuisammaksi sekä täsmällisempään tunnistamiseen, jossa pyritään tunnistamaan useita pintaproteiineja samanaikaisesti. Lupaavista kliinisistä kokeista huolimatta merkittäviä läpimurtoja ei olla vielä saavutettu, ja hoitomuodon turvallisuuden ja tehokkuuden parantamiseksi tarvitaan vielä paljon tutkimusta.

Avainsanat: CAR-T-soluhoido, kiinteä syöpä, pintarakenne, täsmällinen kohdentaminen

Lyhenneluettelo

CAR	Kimeerinan antigeenia sitova reseptori	Treg	T-regulatorinen solu
FDA	Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto	TAM	Tuumoriassosioitunut makrofagi
TM	Solukalvon läpäisevä	MDSC	Myeloidiperäinen suppressorisolu
scFv	Yksiketjuinen vasta-ainefragmentti	PD1	Ohjelmoidun solukuoleman proteiini 1
V _L	Vasta-aineen kevyt ketju	TAA	Tuumoriassosioitunut antigeeni
V _H	Vasta-aineen raskas ketju	HER2	Ihmisen epidermaalinen kasvutekijäreseptori 2
TCR	T-solureseptori	OTOT	On-target off-tumour
CDR	Complementarity determining region	CRS	Sytokiinioireyhtymä
CD	Erilaistumisklusteri	ICANS	Neurotoksinen oireyhtymä
IgG	Immunoglobuliini	KO	Knock-out
IL	Interleukiini	DNR	Dominant-negative-receptor
IFN	Interferoni	FAP	Fibroblastia aktivoiva proteiini
BCMA	B-solun kypsymisantigeeni	i.v.	Suonensisäinen
ITAM	Immunoreseptorin tyrosiiniin perustuva aktivaatioreseptori	synNotch	synteettinen Notch
CXCR	Kemokiinireseptori	CEA	Karsinoembryonaalinen antigeeni
CXCL	Kemokiinireseptorin ligandi	MSLN	Mesoteliini
VEGF	Vaskulaarinen endoteelikasvutekijä	BCAN	Brevican
CAF	Syöpäassosioitunut fibroblasti	GBM	Glioblastooma
ECM	Solunulkoinen matriksi	NOX4	NAPDH oksidaasi 4
TGFβ	Transformoiva kasvutekijä beeta		

1. Johdanto

Syöpä on ollut pitkään yksi yleisimmistä kuolemaan johtaneista sairauksista (1). Vuonna 2022 noin 20 miljoonaa ihmistä sairastui syöpään maailmanlaajuisesti, ja 9,7 miljoonaa menehtyi syövän takia. Vuoteen 2050 mennessä syöpään sairastuneiden määräksi ennustetaan peräti 35 miljoonaa, mikä kuormittaa merkittävästi useiden maiden terveydenhuoltojärjestelmiä (1)

Jo pitkään kiinteiden syöpien keskeisiä hoitoja ovat olleet muun muassa kirurgiset toimenpiteet, sädehoito ja sytostaattihoidot (2). Kirurgiset toimenpiteet ja sädehoito ovat tehokkaita hoitoja syövän alkuvaiheessa, mutta levinneen syövän kohdalla kasvainta on kirurgisesti hankala kokonaisvaltaisesti poistaa (3). Näiden haasteiden myötä kehitetään jatkuvasti uusia hoitomuotoja, joista yksi edelläkävijöistä on immunoterapia (2). Immunoterapian alkujuuret ulottuvat yli sadan vuoden taakse, jolloin William Coley havaitsi, että korkeakuumeiset infektiot auttoivat tiettyjä syöpäpotilaita pääsemään remissioon (4). Coleyn löydösten jälkeen immunoterapeuttiset menetelmät syöpähoidossa ovat kehittyneet valtavasti. Ensimmäiset monoklonaaliset vasta-aineet, rituksimabi ja trastutsumabi, saivat FDA:n hyväksynnän 2000-luvun vaihteessa hematologisten syöpien ja HER2-positiivisen rintasyövän hoitoon (5,6). Noin 10 vuotta myöhemmin Carl June ja hänen tutkimusryhmänsä toteuttivat ensimmäisiä kliinisiä kokeita käyttämällä CAR-T-soluja (7).

CAR-T-soluhoidon perustuu potilaan omien T-solujen muokkaamiseen siten, että ne kykenevät spesifisesti tunnistamaan ja tuhoamaan syöpäsoluja (8). Hoidossa kerätään potilaan omia T-soluja, minkä jälkeen laboratoriossa niihin lisätään kimeerinen antigeeniä sitova reseptori (CAR). CAR koostuu neljästä eri komponentista: solun ulkoinen antigeeniä tunnistava domeeni, saranavyöhyke (engl. hinge), solunkalvon läpäisevä domeeni (engl. transmembrane domain, TM) ja solunsisäinen domeeni. CAR-T-soluvälitteinen aktivaatio tapahtuu siten, että solunulkoinen domeeni tunnistaa syöpäsolun antigeenin ja välittää signaalin solun reseptorin sisäiselle domeenille, mikä laukaisee intrasellulaarisen viestin. Tämä viesti aktivoi T-solun ja aikaansaa sytotoksisen vaikutuksen, joka johtaa syöpäsolujen tuhoamiseen (8). Useiden läpimurtotutkimusten ansiosta vuonna 2017 USA:n elintarvike- ja lääkevirasto FDA (engl. Food and Drug Administration) myönsi hyväksynnän kahdelle CD19-antigeeniin kohdennetulle CAR-T-soluhoidolle B-solulähtöisten hematologisten syöpien hoitoon (9–11). CAR-T-soluhoidon on toistaiseksi hyväksytty vain B-solulähtöisiin hematologisiin syöpiin, eli hoidolla on suhteellisen kapea terapeuttinen vaikutusalue (12). Hematologisten CAR-T-

syöpähoitojen suursaavutusten lisäksi on hoitoja pitkään pyritty kohdistamaan myös kiinteisiin syöpiin. Monista osin lupaavistakin kliinisistä kokeista huolimatta merkittäviä läpimurtoja ei ole vielä saavutettu (13). Keskeisiksi ongelmiksi on havaittu muun muassa CAR-T-solujen kulkeutuminen syöpäkasvaimeen, niiden tunkeutuminen syöpäkudokseen ja säilyminen kudoksessa. Lisäksi kiinteiden syöpien heterogeenisyys, antigeeninen katoaminen, haastava kasvainmikroympäristö ja hoidon haittavaikutukset ovat koituneet keskeisiksi haasteiksi (13). Kandidaattitutkielmani tavoitteena on koota yhteen tutkimusaineistoa, joka käsittelee CAR-T-soluterapiaa, sen keskeisiä haasteita ja potentiaalisia ratkaisuja sekä tulevaisuuden näkymiä hoidon laajentamiseksi kiinteiden syöpien hoitoon.

2. CAR-T-soluhoido

2.1 CAR-rakenne

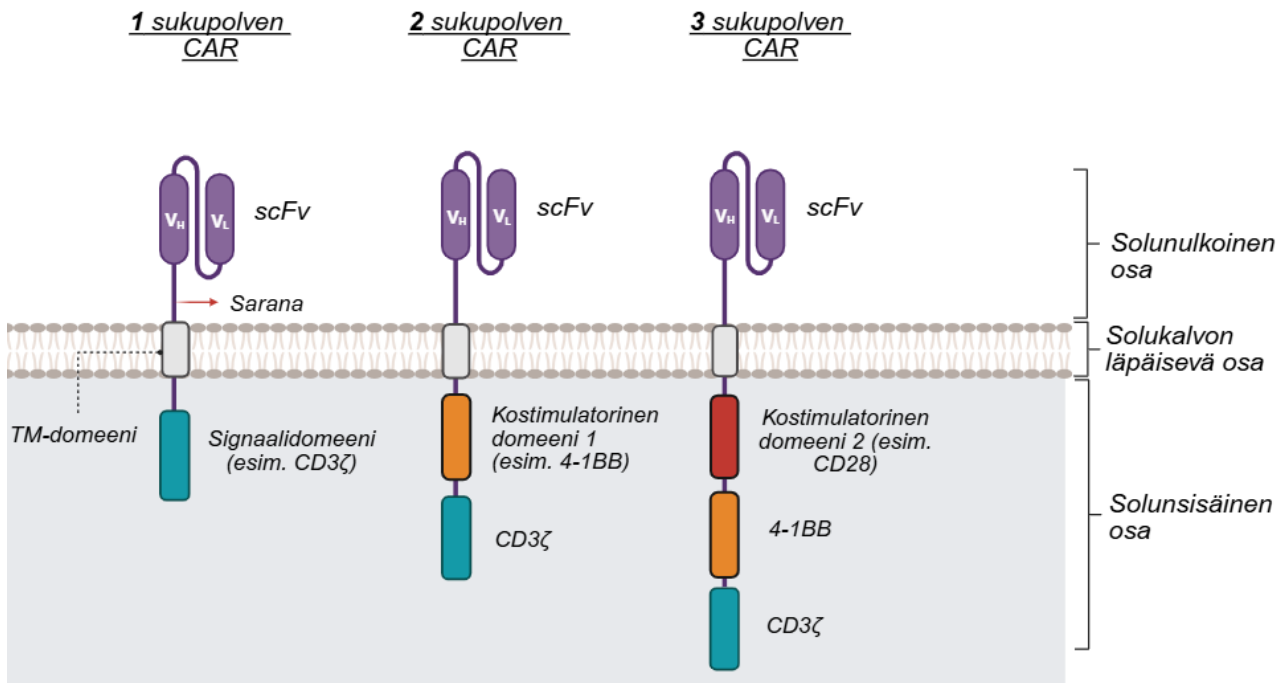
2.1.1 Antigeeniä sitova osa

CAR-rakenteen solunulkoista osaa kutsutaan antigeeniä sitovaksi domeeniksi (Kuva 1), ja tätä muokataan siten, että se kykenee sitoutumaan tiettyyn kasvaimelle ominaiseen antigeeniin (13). Perinteisesti tämä osa on johdettu syöpäantigeenispesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden kevyen (V_L) ja raskaan (V_H) ketjun vaihtelevista domeeneista (14).

V_L ja V_H domeenien väliset vuorovaikutukset eivät kuitenkaan yksinään ole riittävän vahvat stabiiliin antigeenia sitovan domeenin muodostamiseksi. Tämän ratkaisemiseksi V_H ja V_L domeenit liitetään toisiinsa esimerkiksi peptidilinkkerillä, jolloin muodostuu nk. yksiketjuinen vasta-ainefragmentti (engl. single chain variable fragment, scFv) (15). Sekä V_H että V_L domeenissa on kolme niin sanottua CDR-aluetta (engl. complementarity determining regions, CDRs). Nämä alueet ovat hypermuuttuvia (16), mikä viittaa niiden suureen vaihteluun eri vasta-aineiden välillä. CDR-alueet muodostavat domeenin kärjessä sijaitsevan paratoopin, joka välittää sitoutumisen antigeenin epitooppiin (16).

CAR-rakenteet tunnistavat lähtökohtaisesti vain solunulkoisia kohteita ja toimivat MHC-riippumattomasti. Toisin kuin oikeat T-solu-reseptorit (engl. T-cell receptor, TCR), perinteiset CAR-rakenteet eivät ole suunniteltu sitoutumaan solunsisäisiin peptideihin, joita MHC-molekyylit esittelevät (17). Antigeeniä sitovan domeenin tärkeimpiä ominaisuuksia ovat sen spesifisyys ja

affiniteetti, eli kuinka tarkasti ja vahvasti se kykenee sitoutumaan kohdeantigeeniinsa (18). Nämä tekijät pitkälti määräävät millaisen sytotoksisen vasteen CAR-T-solut voivat aiheuttaa syöpäkudoksessa (18).



Kuva 1. Kolmen sukupolven CAR-rakenteet. CAR-rakenne koostuu solunulkoisesta, solukalvon läpäisevästä osasta ja solunsisäisestä osasta. Solunulkoisessa osassa sijaitsee antigeenia sitova scFv-fragmentti, joka perinteisesti koostuu syöpäantigeenispesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden kevyen (V_L) ja raskaan (V_H) ketjun vaihtelevista domeeneista. ScFv-fragmentti on saranarakenteen välityksellä yhdistetty solukalvoon kiinnittyvään transmembraanidomeeniin (TM-domeeni). Kaikkien sukupolvien CAR-T-solujen solunsisäisessä osassa on CD3ζ-signalointidomeeni. Toisen sukupolven CAR-rakenteessa on yksi kostimulatorinen domeeni (esim. 4-1BB), kun taas kolmannen sukupolven CAR-rakenteessa on kaksi kostimulatorista domeenia (esim. 4-1BB ja CD28). Kuva tehty Biorender-ohjelmalla (biorender.com).

2.1.2 Sarana-rakenne

Antigeeniä sitova domeeni yhdistetään TM-domeeniin solunulkoisella saranalla (engl. hinge) (Kuva 1). Sarana lisää CAR-rakenteen solunulkopuoleisen kokonaisuuden vakautta ja parantaa antigeeniä sitovan domeenin liikkuvuutta, mikä mahdollistaa myös steerisistä eli rakenteellisista esteistä ylipääsemisen (18). Tämän lisäksi on havaittu, että saranalla on keskeinen merkitys CAR-rakenteen kulkeutumisessa T-solun solukalvolle. Erityisesti saranan pituudella ja joustavuudella on esitetty olevan tärkeä merkitys tässä (19).

Tutkimuksissa on myös havaittu, että saranan pituus ja joustavuus voi vaikuttaa CAR-T-solujen lisääntymiseen ja sytokiinituotantoon sekä edistää niiden säilyvyyttä ja sytotoksisuutta (20–22). Näissä tutkimuksissa kuitenkin havaittiin, että ihanteellisen saranan valitsemiseen vaikuttavat merkittävästi myös kohdeantigeenin ominaisuudet, kuten sen sijainti ja steerinen asento solupinnalla. Nämä tekijät määräävät, saavutetaanko parempi vaste lyhyellä vai pitkällä saranalla. Saranan aminohapposekvenssi on johdettu useimmiten erilaistumisklusteri CD8- ja CD28-proteiineista (engl. cluster of differentiation, CD) tai immunoglobuliini IgG1- tai IgG4-proteiineista (engl. immunoglobulin, IgG) (13). Myöhemmin on kuitenkin havaittu, että IgG-vasta-aineista johdetut saranavyöhykkeet voivat muodostaa sidoksia IgG vasta-aineiden Fc-gamma-reseptorien (Fc γ) kanssa, mikä voi johtaa luontaisen immuniteetin epätoivottuun aktivaatioon (23).

2.1.3 Solukalvon läpäisevä osa (TM-domeeni)

TM-domeenin ensisijainen tehtävä on ankkuroida CAR-rakenne kiinni solukalvoon ja tukea sen vakautta (Kuva 1) (13). TM-domeeni johdetaan yleisesti CD3 ζ -, CD4-, CD28- ja CD8 α -proteiineista. Kukin näistä tuottaa useita toiminnallisia eroja CAR-rakenteeseen (13). CD3 ζ -TM-domeeni on laajasti tutkittu ja yleisesti käytetty, koska se kykenee muodostamaan dimeerirakenteita ja integroitumaan endogeenisten TCR-reseptorien kanssa, edistäen CAR-T-soluvälitteistä aktivaatiota (18). Myös CD28-TM-johdetuilla domeeneilla on havaittu taipumusta muodostaa heterodimeerejä endogeenisten CD28-proteiinien kanssa ja siten herkistää CAR-T-solujen aktivoitumista sekä edistää niiden säilymistä ja lisääntyvyyttä (24).

Tutkimustulokset ovat myös osoittaneet, että eri TM-domeenit vaikuttavat synergisesti muiden CAR-komponenttien kanssa (18). Tämä tekee TM-domeenien huomioimisesta keskeisen osan CAR-rakenteen suunnittelua. Eräässä tutkimuksessa havaittiin, että yhdistämällä CD8 α :n-TM-domeeni ja saranarakenne, voidaan CAR-T-solujen sytokiinituotantoa vähentää ja niiden alttiutta aktivaatioindusoidulle solukuolemalle pienentää (engl. activation induced cell death, AICD) verrattuna CD28:aan perustuvien CAR-T solujen vastaaviin ominaisuuksiin (25)

2.1.4 Solunsisäinen domeeni

Solunsisäinen osa on niin ikään keskeinen kiinnostuksen kohde CAR-rakenteiden suunnittelussa. Se koostuu yhdestä varsinaisesta signaalidomeenista ja yhdestä tai useasta kostimulatorisesta

domeenista (Kuva 1) (26). Ensimmäisten CAR-rakenteiden solunsisäiset domeenit koostuvat vain TCR-reseptorin CD3 ζ -johdetuista proteiineista (26). CD3 ζ -proteiineissa on immunoreseptorien tyrosiiniin perustuvia aktivaatiomotiiveja (ITAM), jotka fosforyloituvat, kun CAR-rakenne sitoutuu antigeeniinsä, mikä johtaa T-solujen aktivoitumiseen (27). Näitä kutsutaan ensimmäisen sukupolven CAR-rakenteiksi (Kuva 1).

Pian kuitenkin havaittiin, että tämä yksinään ei riittänyt tuottamaan riittävän tehokasta immuunivastetta. Ymmärrettiin, että kostimulatorinen signaali on välttämätön CAR-T-solujen tarkoituksenmukaiselle aktivaatiolle ja säilymiselle (28). Kostimulatoristen domeenien, kuten CD28:n, merkitys on ollut tunnettu jo pitkään naiivien T-solujen TCR-välitteisessä aktivaatiossa. Niiden on todettu lisäävän T-solujen interleukiini-2 (IL-2) -tuotantoa sekä tehostavan sytotoksista vastetta, lisääntyvyyttä ja säilymistä (29). Samankaltaiset vaikutukset huomattiin myös CAR-T-soluissa (30), mikä johti toisen sukupolven CAR-rakenteiden kehittämiseen (Kuva 1).

Ensimmäisten FDA:n hyväksymien CAR-T-solujen solunsisäiset domeenit koostuvat CD3 ζ - signaalidomeenista sekä joko CD28- tai 4-1BB-kostimulatorisesta domeenista. Kiinnostavaa on, että näiden kostimulatoristen domeenien vaikutukset eroavat merkittävästi sekä metabolisesti että aikaansaadun immuunivasteen osalta. CD28-kostimulatorinen domeeni ohjaa CAR-T-soluja efektorimuisti-T-soluiksi, kun taas 4-1BB-kostimulatorinen domeeni edistää erilaistumista keskusmuisti-T-soluiksi (31). Tällä on keskeinen merkitys immuunivasteessa. CD28-kostimulatoriset CAR-T-solut tuottavat voimakkaamman, mutta lyhytkestoisemman sytotoksisen vasteen, kun taas 4-1BB-kostimulatoriset CAR-T-solut tuottavat pitkäkestoisemman ja hillitymmän vasteen (32). Näiden erojen taustalla olevia mekanismeja ei kuitenkaan vielä täysin ymmärretä.

Muitakin lupaavia kostimulatorisia, kuten esimerkiksi ICOS, OX40, CD27 ja CD40, domeeneja tutkitaan aktiivisesti (13). Lisäksi on tutkittu useiden kostimulatoristen domeenien liittämistä yhteen signaalidomeeniin, jonka on oletettu tuottavan CAR-T-soluissa kokonaisvaltaisemman aktivaation ja vasteen. Tämän myötä nykyisin puhutaan jo kolmannen (Kuva 1), neljännen ja jopa viidennen sukupolven CAR-T-soluista (33). Tutkimustulokset eivät kuitenkaan ainakaan toistaiseksi ole osoittaneet, että kolmannen sukupolven CAR-T-solut, joissa signaalidomeeniin on liitetty kaksi kostimulatorista domeenia, olisivat tehokkaampia kuin toisen sukupolven CAR-T-solut (34,35).

2.2 CAR-T-soluhoido nykypäivän kliinisessä työssä

CAR-T-soluhoido on mullistanut useiden hematologisten syöpien hoidon, joihin kuuluu muun muassa B-solulähtöinen akuutti leukemia (B-ALL), suurisoluiainen B-solulähtöinen lymfooma (LBCL), manttelisolulyymfooma, follikulaarinen lymfooma ja multippeli myelooma (36). Tähän mennessä kuusi CAR-T-soluterapiaa on saanut FDA:n hyväksynnän näiden sairauksien hoitoon (36). Näistä neljässä CAR-rakenne kohdistuu B-soluille ominaiseen CD19-pintaproteiiniin ja kahdessa B-solujen kypsymsiantigeeniin (engl. B-cell maturation antigen, BCMA) (36). Nämä pintaproteiinit ovat usein yli-ilmentyneitä B-solulähtöisissä hematologisissa syöissä (37–39). Tämä tekee niistä erinomaisia kohteita CAR-T-soluille, joita voidaan muokata tunnistamaan ja tappamaan ainoastaan B-soluja, jättäen muut kudokset rauhaan (40). Hoitojen myötä malignien B-solujen lisäksi tuhoutuvat myös terveet B-solut, mikä johtaa potilaan tilapäiseen immuunipuutokseen (41). B-soluilla on kuitenkin todettu olevan hyvä regeneraatiokyky, minkä vuoksi useimpien hoitoa saaneiden potilaiden immuunijärjestelmä korjaantuu ajan myötä (41,42).

CAR-T-soluhoido on nykypäivän kliinisessä työssä tärkeä hoitovaihtoehto potilaille, joille muut hoidot eivät ole tehonneet (36). Hoito on kuitenkin kallis, eikä sitä toistaiseksi voida tarjota kaikille sitä tarvitseville (43). Viime vuosikymmenien aikana on CAR-T-soluhoidoa pyritty kohdentamaan myös kiinteiden syöpien hoitoon, mutta niiden kohdalla haasteita on huomattavasti enemmän, joita käsittelemme myöhemmissä osioissa (3.1–3.3).

3. CAR-T soluhoidon keskeiset haasteet kiinteiden syöpien hoidossa

3.1 CAR-T-solujen navigointi, toiminta ja säilyvyys kasvainympäristössä

Yksi keskeisimpiä haasteita kiinteiden kasvainten CAR-T-hoidossa liittyy niiden säilymiseen elimistössä ja tehokkaaseen pitkäaikaiseen hoitovasteeseen (44). Hoidoissa on havaittu, että potilaassa CAR-T solujen huippupitoisuus saavutetaan noin 7–14 päivää infuusion jälkeen, mutta jo kuukauden jälkeen solupitoisuudet laskevat huomattavasti (45). Sen sijaan hematologisten syöpien hoidossa potilaissa on havaittu huomattavasti voimakkaampaa CAR-T-solujen lisääntymistä ja niiden pitkäaikaista säilymistä (46). Korkeat CAR-T-solupitoisuudet voivat säilyä potilaassa jopa vuosia (47). Vaikka tarkat mekanismit CAR-T-solujen toiminnan heikkenemisen takana kiinteiden syöpien hoidossa ovat osin epäselviä, tiedetään, että CAR-T-solujen liikkuvuus, tunkeutuminen

kasvaimeen ja kasvaimen immunosuppressiivinen mikroympäristö vaikuttavat merkittävästi tähän ilmiöön (45).

3.1.1 CAR-T-solujen soluliikenne ja syöpäkudokseen tunkeutuminen

CAR-T-solujen kulkeutumista ja tunkeutumista tuumorialueelle säätelevät tarttumisproteiinit kuten selektiinit (esim. E- ja P-selektiini) ja integriinit (esim. lymphocyte function-associated antigen 1, LFA-1) sekä kemokiinit (esim. CXCL9, CXCL10 ja CXCL11) ja kemokiinireseptorit (esim. CXCR3 ja CXCR4) (48). Syöpäkudosta ympäröivien verisuonten endoteeli tuottaa kemokiinejä, jotka sitoutuvat CAR-T-solujen kemokiinireseptoreihin, mikä johtaa CAR-T-solujen siirtymiseen syöpäkudokseen niin kutsuttua kemokiinigradienttia pitkin. Tunkeutumista säätelevät selektiinit ja integriinit mahdollistavat CAR-T-solujen tarttumisen endoteeliin sekä lopulta siirtymisen verisuonesta kemokiinigradienttia pitkin kasvaimeen (engl. extravasation) (48).

Yksi merkittävä haaste CAR-T-solujen tunkeutumisessa liittyy kasvaimen verisuonistoon. On havaittu, että kiinteät kasvaimet kasvavat vähähappisessa ympäristössä, mikä usein lisää verisuonitusta lisääviä signaalimolekyylejä, kuten vaskulaarista endoteelikasvuvutekijää (engl. vascular endothelial growth factor, VEGF) (49). VEGF ohjaa muun muassa verisuonten uudismuodostusta, mutta sen yli-ilmentymisellä on havaittu myös immunosuppressiivisia vaikutuksia (50). Niistä yksi merkittävä liittyy endoteelin kiinnittymisproteiinien katoamiseen verisuonten endoteelistä (esim. intrasellulaarinen adheesiomolekyylä 1, ICAM1), mikä on yhdistetty niin kutsuttuun endoteelisoluanergiaan, jossa CAR-T-solujen tunkeutuminen tuumorialueelle vaikeutuu (51).

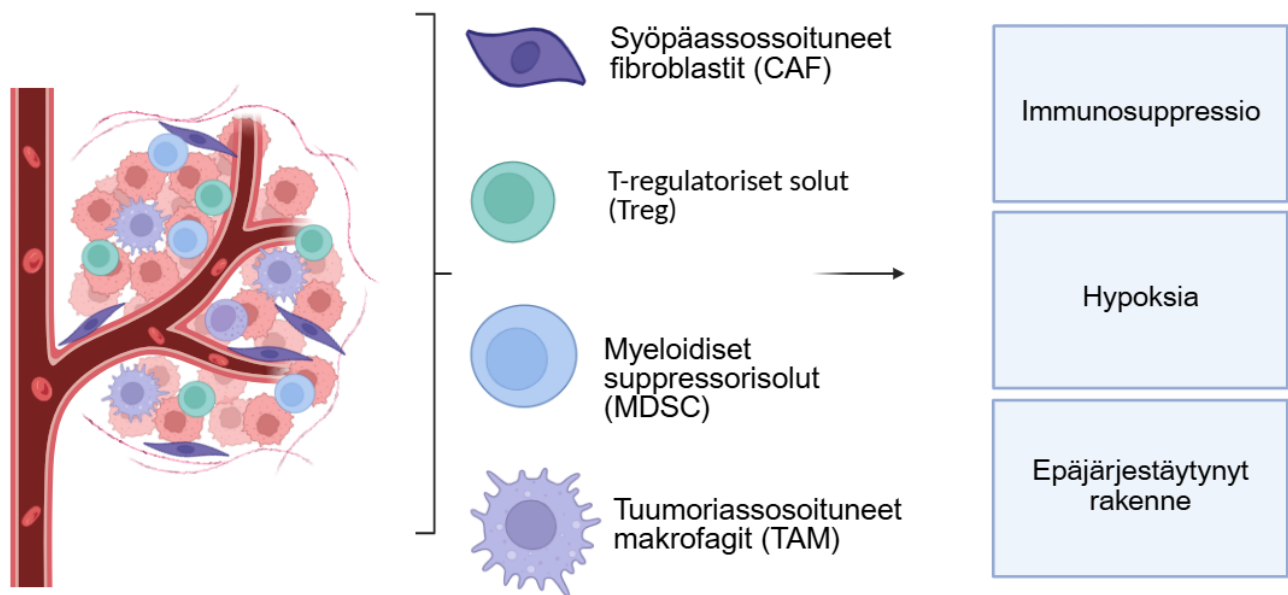
Kemokiineillä on keskeinen vaikutus sytotoksisten T-solujen ohjautumisessa tulehdusalueille (52). T-solut ilmentävät useita kemokiinireseptoreja, joista yksi merkittävimmistä on CXCR3. Sen on havaittu edistävän T-solujen tunkeutumista kiinteisiin kasvaimiin sekä lisäävän proinflammatoristen ja kasvainten kasvua hillitsevien välittäjäaineiden tuotantoa (esim. interferoni-gamma, IFN- γ), esim. sarkoomassa ja munuaissyövässä (53,54). CAR-T-hoitojen keskeinen ongelma syntyy, kun CAR-T-solujen kemokiinireseptorit ja kasvaimen tuottamat kemokiinit eivät vastaa toisiaan, johtaen nk. kemokiini/kemokiinireseptori yhteensopimattomuuteen (engl. chemokine/chemokine receptor mismatch) (48). Tällöin CAR-T-solut eivät kykene tunnistamaan syöpäkudoksen tuottamia kemokiinejä, mikä estää niitä hakeutumasta syöpäkudokseen. Syöpäsolut mutatoituvat jatkuvasti ja

niiden kemokiiniprofiilit voivat myös vaihdella syövän edetessä (55), mikä voi lisätä kemokiini/kemokiinireseptori yhteensopimattomuutta ja vaikeuttaa CAR-T-solujen pääsyä tuumoriin. CXCR3:n keskeisiä kemokiiniligandeja ovat CXCL9, CXCL10 ja CXCL11, ja niiden yhteensopimattomuuden on havaittu olevan merkittävä syy heikentyneeseen CD8⁺-T-solujen tunkeutumiseen gliomassa (56).

CAR-T-solujen on navigoitava syöpäkudoksessa hyvin tiiviissä sekä epäjärjestäytyneessä mikroympäristössä, jossa esiintyy monia fyysisiä esteitä niiden liikkumiselle. Syöpäassosioituneet fibroblastit (engl. cancer-associated fibroblasts, CAF) ovat keskeisessä roolissa tämän haastavan tuumorimikroympäristön muodostumisessa (Kuva 2) (57). CAF:t ovat nopeasti jakautuvia erilaistuneita fibroblasteja, jotka tuottavat hallitsemattomasti syöpäkudoksessa solunulkoisen matriksin (ECM) komponentteja, kuten esimerkiksi tyypin 1 kollageenia ja fibronectiiniä (57). Tämä luo rakenteeltaan epänormaalin ja jäykemmän mikroympäristön verrattuna terveeseen kudokseen, mikä vaikeuttaa CAR-T-solujen liikkumista (58). Lisäksi CAF:t erittävät tuumorin kasvua ja immunosuppressiota edistäviä sytokiineja, erityisesti transformoiva kasvutekijä-β:tä (TGFβ) (59). TGFβ:n on havaittu vähentävän T-solujen CXCR3-kemokiinireseptorien ilmentymistä (59), mikä saattaa vaikeuttaa CAR-T-solujen tunkeutumista kasvaimen. Koska CAF:t tuottavat runsaasti syövän kasvua edistäviä proteiineja, niistä on toisaalta myös tullut kiinnostava terapeutinen kohde CAR-T-hoidossa.

3.1.2 Immunosuppressiivinen mikroympäristö

Kasvaimen mikroympäristö on usein voimakkaasti immunosuppressiivinen, mikä on havaittu CAR-T-hoidossa merkittäväksi ongelmaksi (60). Useat kasvaimen solutyypit edistävät immuunijärjestelmän lamaantumista ja sitä kautta syövän kasvua (60). Edellä jo mainittujen CAF-solujen lisäksi kolme keskeistä näistä solutyypeistä ovat T-regulatoriset solut (Treg), tuumoriassoituneet makrofagit (TAM) ja myeloidiperäiset suppressorisolut (engl. myeloid derived suppressor cells, MDSC), joiden kanssa CAF-solut ovat kiinteässä vuorovaikutuksessa (Kuva 2).



Kuva 2. Immunosuppressiivinen kasvainmikroympäristö. Kasvainmikroympäristö (vasemmalla) on hyvin monimuotoinen kokonaisuus, joka koostuu syöpäsolujen lisäksi myös monista muista solutyypeistä, jotka edistävät kasvaimen kasvua. Näihin kuuluvat muun muassa syöpäassosioituneet fibroblastit (CAF-solut), T-regulatoriset solut (Treg-solut), myeloidiset suppressorisolut (MDSC) ja tuumoriassosioituneet makrofagit (TAM). Nämä solut yhdessä muokkaavat kasvainmikroympäristöä immunosuppressiiviseksi ja vähähappiseksi (hypoksia) sekä sen rakenteesta epäjärjestäytyneen. Tämä vaikeuttaa CAR-T-solujen pääsyä syöpäkudokseen ja heikentää merkittävästi niiden toimintakykyä. Kuva tehty Biorender-ohjelmalla (biorender.com).

Treg-solut ovat osa hankittua immuunijärjestelmää, ja ne säätelevät immuunivastetta muun muassa hillitsemällä sytotoksisten T-solujen toimintaa. Normaalisissa tulehdusreaktioissa Treg-solut ja sytotoksiset T-solut ylläpitävät tasapainoista immuunivastetta, mutta kasvainmikroympäristössä tämä tasapaino häiriintyy (61). On havaittu, että kasvaimissa, joissa on ylimäärin Treg soluja, hoitovaste tai ennuste on huonompi. Näitä havaintoja on tehty esimerkiksi glioblastoomassa ja munasarjasyövässä (62,63). CAR-T-hoidossa Treg-solujen on todettu heikentävän sekä CAR-T-solujen kulkeutumista kasvaimeen että niiden säilyvyyttä kasvaimeen (64).

Myös makrofagit vaikuttavat CAR-T-solujen hoitovasteeseen ja ovat osa synnynnäistä immuunipuolustusta. Makrofagit erilaistuvat verenkierrossa kulkevista monosyyteistä ja ne jaotellaan kahteen päätyyppiin: proinflammatorisiin M1-makrofageihin ja anti-inflammatorisiin M2-makrofageihin (65). Kasvaimen mikroympäristössä monosyytit erilaistuvat tuumoriassosioituneiksi makrofageiksi (TAM), jotka ilmentyvät useimmiten anti-inflammatorisina M2-tyyppin makrofageina (66). Kasvainmikroympäristössä Treg-solut ja M2-tyyppin makrofagit tuottavat

immunosuppressiivisia sytokiinejä (esim. TGF- β) ja ilmentävät pinnallaan immuunijarrumolekyylejä, kuten ohjelmoidun solukuoleman proteiini ligandi 1:tä (PD-L1). On havaittu, että nämä sytokiinit ja immuunijarrumolekyylit toiminnallisesti uuvuttavat (engl. exhaustion) CAR-T-soluja sekä heikentävät niiden säilyvyyttä (67).

Seuraava este CAR-T-solujen hoitovasteen tiellä ovat myeloidiperäiset suppressorisolut (MDSC), jotka ovat patologisesti aktivoituneita monosyyttejä ja neutrofiilejä. Niiden erilaistumista säätelevät muun muassa interleukiinit (esim. IL-6, IL-13 ja IL-4), IFN- γ ja VEGF (68). MDSC:t ovat erityisen immunosuppressiivisia ja edistävät tuumorin kasvua sekä leviämistä (68). Kiinteiden syöpien CAR-T-hoidossa on havaittu, että ne tukahduttavat CAR-T-solujen immuunivastetta useilla eri mekanismeilla (69). Ne muun muassa lisäävät IL-10- ja TGF- β -sytokiinien tuotantoa, mikä edistää Treg-solujen kertymistä kasvaimeen, sekä ohjaavat tuumoriassoituneita M1-tyypin makrofageja muuttumaan M2-tyypin makrofageiksi (70,71). M2-tyypin makrofagit puolestaan tuottavat MDSC:ja houkuttelevia inflammatorisia tekijöitä, kuten IL-10:tä, mikä luo itseään vahvistavan positiivisen takaisinkytkentäjärjestelmän (71). TAM:it, Treg-solut ja MDSC:t muodostavat kasvainmikroympäristössä monimutkaisen kokonaisuuden, jossa niiden keskinäiset vuorovaikutukset systemaattisesti ohjaavat immuunijärjestelmää lamaan.

3.2 On-target off-tumour-ilmiö

Kohdeantigeenien onnistunut valinta on yksi keskeisimmistä tekijöistä syöpien CAR-T-hoidossa. Kiinteissä kasvaimissa yli-ilmentyviä antigeenejä kutsutaan tuumoriassoituneiksi antigeeneiksi (TAA). TAA:ta esiintyy kuitenkin pienempinä määrinä myös terveissä kudoksissa, minkä takia CAR-T-solujen vaikutus kohdistuu myös niihin. Tätä ilmiötä kutsutaan on-target off-tumour-ilmiöksi (OTOT) (72). Yksi tyypillinen TAA on ihmisen epidermaalinen kasvutekijäreseptori-2 (engl. human epidermal growth factor receptor 2, HER2), jonka yli-ilmentymää on havaittu useissa syöpätyypeissä. Laajassa tutkimuksessa, jossa analysoitiin 37 992 eri syöpäpotilasta, HER2:n yli-ilmentymä todettiin merkittäväksi useissa eri syövissä (73). Tämä on tehnyt siitä kiinnostavan kohteen myös kiinteiden syöpien CAR-T-soluhoidolle, mutta hoitoihin on liittynyt huomattavia OTOT-haittavaikutuksia. Esimerkiksi eräässä Faasi 1 HER2-CAR-T-hoitokokeessa rintasyöpäsyöpäpotilaille kehittyi nopeasti hengitysvajaus ja keuhkoödeema (74). Myöhemmin potilas kärsi kahdesta sydämenpysähdyksestä, johtaen lopulta kuolemaan.

Ihanteellisinta olisi siis löytää täysin tuumorispesifinen antigeeni, niin kutsuttu neoantigeeni, jotta CAR-T-solut voisivat tuhota kohdennetusti ainoastaan syöpäsoluja. Neoantigeenien yllilylmentyminen syövässä ja etenkin niiden pinnalla on kuitenkin harvinaista, ja toistaiseksi vain muutamia tällaisia neoantigeneja (esim. EGFRvIII glioblastoomassa) on onnistuttu karakterisoimaan (75). Tilannetta vaikeuttaa lisäksi se, että vaikka löydetään sopiva kohdeantigeeni, syövän monimuotoisuuden takia sen ilmentyminen voi vaihdella solujen välillä tai puuttua osasta soluista kokonaan. Näin ollen osa syöpäsoluista jää CAR-T-soluilta huomaamatta. Huomionarvoista on myös se, että kohdeantigeenien ilmentyminen kasvaimessa saattaa vähentyä CAR-T-hoidon seurauksena tai jopa hävitä kokonaan ilmiössä, jota kutsutaan antigeeniseksi katoamiseksi (engl. antigen escape) (76). Tällöin syöpäsolu pyrkii välttämään immuunivastetta vähentämällä antigeenien ilmentymistä solupinnallaan (76). Näiden ongelmien ratkaisemiseksi on kehitelty strategioita, joissa CAR-T-soluja pyritään kohdentamaan useampiin eri kohdeantigeneihin. Näitä lähestymistapoja käsittelem tarkemmin osiossa 4.2.

3.3 Haittavaikutukset

CAR-T-soluhoidon liittyy usein myös eriasteisia haittavaikutuksia. Hematologisten sairauksien CAR-T-hoidoissa yleisimpiä vakavia haittavaikutuksia ovat sytokiinioireyhtymä (engl. cytokine release syndrome, CRS) ja neurotoksinen ICANS-oireyhtymä (engl. immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome, ICANS) (77). Näistä erityisesti sytokiinioireyhtymää on havaittu myös kiinteiden syöpien CAR-T-hoidoissa (78,79). Vakavissa tapauksissa, kuten esimerkiksi kappaleessa 3.2 mainitulla rintasyöpäpotilaalla, CRS:n uskottiin johtuvan OTOT-ilmiöstä (74). ICANS oireyhtymää on havaittu pääasiassa CD19-CAR-T-hoidoissa, mutta sitä on raportoitu myös esimerkiksi glioblastooman CAR-T hoidossa (78).

CAR-T-solujen tappaessa syöpäsoluja syntyy paikallinen tulehdustila, jossa sekä CAR-T solut että kuolleet syöpäsolut tuottavat pro-inflammatorisia tekijöitä, kuten interleukiineja (esim. IL-6), interferoneja (esim. IFN- γ) sekä tuumorin nekroositekijöitä (esim. TNF- α) (77). Näiden tulehdustekijöiden on havaittu olevan keskeisiä CRS:n ja ICANS:n kehittymisessä, ja ne voivat voimistaa tulehdusta aktivoimalla muita lähellä olevia immuunisoluja tuottamaan lisää tulehdustekijöitä (77,80). Jos tulehdus voimistuu liikaa, voi tulehdus muuttua paikallisesta systeemiseksi ja johtaa sytokiinioireyhtymään. ICANS-oireyhtymä tunnetaan patofysiologialtaan huonommin, mutta sen on havaittu esiintyvän usein sytokiinioireyhtymän yhteydessä. Tällöin

tulehdustekijät aiheuttavat muun muassa veriaivoesteen tuhoutumista ja sitä kautta aiheuttaa neurotoksisuutta (80).

CRS diagnosoidaan kliiniseen kuvan perusteella, ja se jaetaan neljään vakavuusasteeseen (81). Aluksi potilailla esiintyy tyypillisesti muun muassa kuumetta, takykardiaa ja hengitysvaikeuksia, ja vakavimmillaan CRS voi johtaa monielinvaurioihin tai kuolemaan (81). Sytokiinioireyhtymä on tunnettu ilmiö jo pitkään, ja sitä on havaittu myös muissa immunoterapeuttisissa hoidoissa, esimerkiksi PD-1-vasta-ainehoidoissa (82). Toistaiseksi ainoa FDA:n hyväksymä lääke vakavan sytokiinioireyhtymän hoitoon on IL-6-reseptoreihin sitoutuva tosilitsumabi (83). Kuitenkin huolimatta tosilitsumabilääkehoidoista vakavia sytokiinioireyhtymätapauksia esiintyy edelleen (84). Tämän vuoksi pyritään kehittämään tehokkaampia keinoja sytokiinioireyhtymän ehkäisemiseksi, joita käsitellen kappaleessa 4.3.

4. Strategioita CAR-T-soluhoidon kiinteiden syöpien haasteiden ratkaisemiseksi

4.1 CAR-T-solujen kulkeutumisen tehostaminen, säilyvyyden parantaminen ja uupumisen ehkäisy kasvainmikroympäristössä

Kuten aiemmin todettu, kasvainten erittämien kemokiinien ja CAR-T-solujen kemokiinireseptorien yhteensopimattomuus sekä verisuoniston toimintahäiriöt muodostavat merkittäviä haasteita kiinteiden syöpien hoidossa. Näihin haasteisiin on pyritty vastaamaan muun muassa muokkaamalla CAR-T-soluja älykkäämmiksi tai muuttamalla kasvaimen mikroympäristöä CAR-T-soluja suosivammaksi. CAR-T-soluja on esimerkiksi muokattu ilmentämään tiettyjä kemokiinireseptoreita, kuten CXCR2:ta, jotta ne reagoisivat tehokkaammin kasvaimen kemokiiniprofiiliin (85). Eräässä maksakarsinooman ksenograftimallissa CXCR2:ta ilmentävät CAR-T-solut tunkeutuivat kasvaimeen huomattavasti tehokkaammin (85). Toinen strategia CAR-T-solujen kasvaimeen pääsyn tehostamiseksi on kasvaimen verisuoniston normalisointi. Tätä on pyritty saavuttamaan anti-VEGF-hoidolla, joka estää VEGF:n toimintaa. Tutkimuksessa havaittiin, että anti-VEGF parantaa kasvainmikroympäristön happipitoisuutta sekä lisää CAR-T-solujen tunkeutumista kasvaimeen (86).

Tehostetun kulkeutumisen lisäksi on tärkeää kehittää strategioita, jotka torjuvat immunosuppressiivista mikroympäristöstä. TGF- β -sytokiini ja PD-1-immuunijarrumolekyylit ovat keskeisiä immunosuppressiivisen kasvainmikroympäristön tekijöitä, jotka aiheuttavat CAR-T-solujen uupumista ja heikompaa säilyvyyttä (58). Näitä vaikutuksia on pyritty estämään muun muassa

geenimuokkauksella. Esimerkiksi PD-1 ja TGFBR2-geenien poistolla (engl. knock-out, KO) CRISPR-Cas9-tekniikalla on voitu estää PD-L1:n ja TGF- β :n vaimentavia vaikutuksia CAR-T-soluissa (87). Näissä tutkimuksissa on raportoitu CAR-T-solujen parempaa säilyvyyttä ja vähäisempää toimintahäiriötä (88,89). Toisaalta on myös havaittu, että esimerkiksi PD-1-geenin poistaminen saattaa heikentää CAR-T solujen pitkäaikaista lisääntymiskykyä (90), mikä herättänyt keskustelua strategian hyödyllisyydestä (90,91).

Toinen tapa torjua TGF- β :n ja PD-L1:n vaikutuksia on ilmentää CAR-T-soluissa niin kutsuttuja dominant-negative-reseptoreja (DNR) (58). Näistä reseptoreista puuttuvat aktivoivat signaalidomeenit, ja ne sitovat ligandejaan kilpailevasti, jolloin muodostuu toimintakyvyttömiä ligandi-reseptorikomplekseja (92). Tämä estää ligandien toiminnan. Ksenograftimalleissa TGF- β -DNR-CAR-T- ja PD-1-DNR-CAR-T-solut ovat osoittaneet parempaa toimintakykyä, säilyvyyttä ja lisääntyvyyttä (92,93). Lisäksi niissä havaittiin vähäisempää normaalien T-solujen taipumusta erilaistua Treg-soluiksi (92,93), mikä voi osaltaan lisätä proinflammatorisia vaikutuksia kasvainmikroympäristössä.

Myös kasvainalueen vaikean mikroympäristön ohittamiseksi on kehitetty useita eri strategioita. Yksi lähestymistapa CAR-T soluja muokkaaminen tuottamaan ECM:a hajottavia entsyymejä (94). Eräässä *in vitro* tutkimuksessa CAR-T-soluja muokattiin tuottamaan heparanaasia, joka hajottaa tehokkaasti hepariini-sulfaatti-proteoglykaaneja (HSPG) joita esiintyy kasvainmikroympäristössä runsaasti (95). Heparanaasi paransi merkittävästi CAR-T-solujen toimintakykyä kasvainmikroympäristössä (95). Toinen keino haastavan mikroympäristön voittamiseksi on estää ECM:ää tuottavien CAF-solujen toimintaa. Prekliinisissä tutkimuksissa on CAR-T soluja kohdennettu myös fibroblastia aktivoivaan proteiiniin (FAP), jota usein ilmentyy CAF-soluissa (96,97). Tuloksissa havaittiin, että FAP-CAR-T-solut kykenivät tuhoamaan syöpäkudosta tehokkaasti ja vähentämään muun muassa MDSC:n rekrytoitumista kasvainmikroympäristöön (96,97). Toisaalta toisessa tutkimuksessa FAP:n suora kohdentaminen CAR-T-soluilla osoittautui erittäin toksiseksi (98), mikä on herättänyt keskustelua strategian soveltuvuudesta terapeutiseen käyttöön.

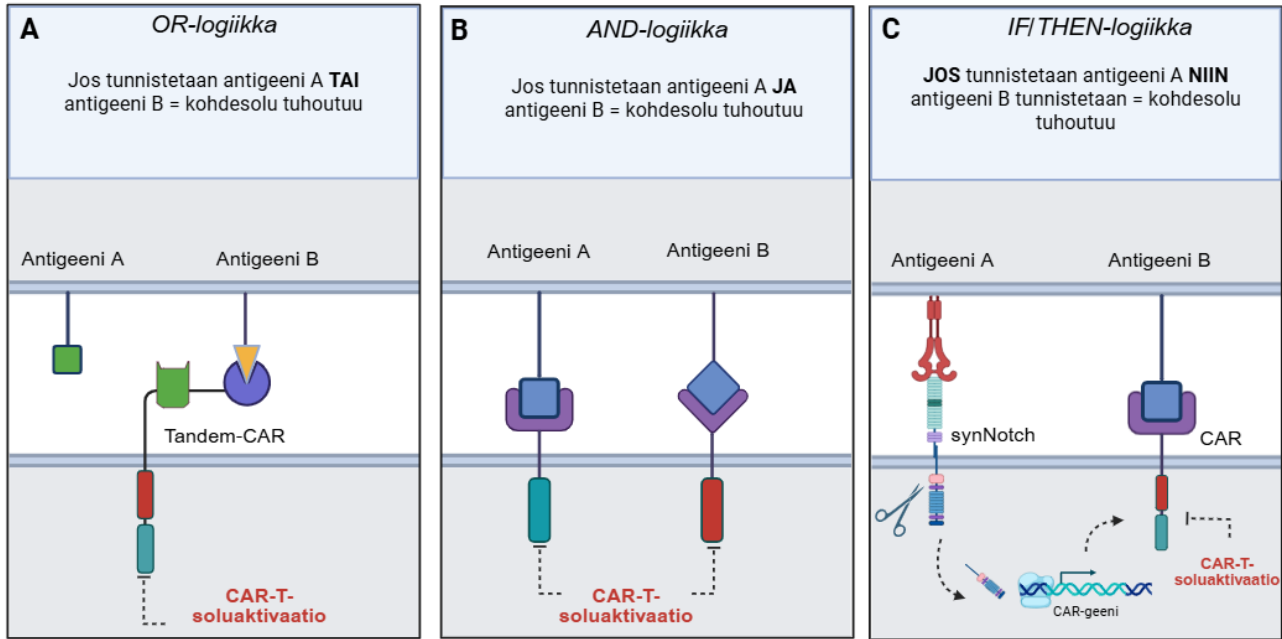
Yksi muista poikkeava, mutta lupaava lähestymistapa on CAR-T-solujen annostelutavan muuttaminen suonensisäisestä (i.v.) paikalliseksi (99). Perinteisesti CAR-T-soluja annostellaan potilaalle laskimoon, jolloin niiden täytyy löytää kasvaimeen, tunkeutua siihen ja lopulta navigoida kasvaimensisäisiin syöpäsolurikkaisiin alueisiin. Kasvainalueeseen suoraan kohdistuvaa annostelua on tutkittu muun muassa aivokasvaimissa, mesotelioomassa ja maksasyövässä (99).

Ksenograftimalleissa on havaittu, että CAR-T-solujen kasvaimensisäisessä annostelussa on aikaansaatu voimakkaampia sytotoksisia vasteita kuin i.v.-annostelussa (100,101). Kliinisissä tutkimuksissa se on todettu turvalliseksi (102), mutta vakuuttavaa näyttöä sen paremmuudesta ei ole vielä esitetty.

Etäpesäkkeet kuitenkin rajoittavat oleellisesti kasvaimensisäistä annostelua. Toisaalta paikallinen annostelu on sovellettavissa myös muihin kasvainta ympäröiviin tiloihin, kuten esimerkiksi selkäydinnesteeseen keskushermostokasvaimissa tai keuhkopussin alueelle mesotelioomassa (99). Erityisesti aivokasvainten CAR-T-hoidoissa on havaittu, että annostelu selkäydinnesteeseen eli intratekaalinen annostelutapa on saanut aikaan poikkeuksellisen hyviä hoitovasteita (103).

4.2 Strategioita on-target off-tumour-ilmion voittamiseksi

Koska OTOT-ilmio voi aiheuttaa vakavia haittoja, sen estämiseksi on kehitetty useita strategioita. Tavoitteena on luoda CAR-T-soluja, jotka kykenevät tunnistamaan ja tuhoamaan syöpäsoluja entistä tarkemmin ilman, että ne kohdistuvat terveisiin kudoksiin. Tämä on vaatinut moniulotteista lähestymistapaa, jossa CAR-T-soluissa hyödynnetään yhä monimutkaisempia syövän tunnistamisjärjestelmiä. Näissä lähestymistavoissa on sovellettu muun muassa Boolean logiikkaan perustuvia menetelmiä (104). Ne perustuvat matemaattisiin operaattoreihin kuten AND-, OR ja IF/THEN-logiikoihin (Kuva 3) (72). Näiden logiikoiden avulla voidaan luoda tietyt ehdot CAR-T-solun aktivoinnille, kun se tunnistaa syöpäsolun.



Kuva 3. Logiikkaohjatut CAR-T-solumallit. Boolean-logiikkaan perustuvia matemaattisia malleja, kuten AND-, OR- ja IF/THEN-logiikoita, on pystytty soveltamaan spesifisempään ja tarkempaan CAR-T-solujen syöpäsolujen tunnistukseen. Tämä mikä on muun muassa vähentänyt OTOT-haittavaikutuksia ja parantanut CAR-T-solujen toimintakykyä. **OR-logiikkamalli (A)** perustuu siihen, että CAR-T-solu muokataan tunnistamaan kahta syöpäsolujen pinta-antigeeniä, esimerkiksi tandem-rakenteessa, joista vain toisen tunnistus riittää aktivaatioon. **AND-logiikkamalli (B)** toimii siten, että tarkoituksenmukainen ja pitkäkestoinen CAR-T-soluvaste edellyttää kahden antigeenin samanaikaista tunnistusta. **IF/THEN-logiikkamalli (C)** perustuu malliin, jossa CAR-rakenne aktivoituu tai siirtyy solukalvolle vain tietyn ehdon täytyttyä. Tästä hyvä esimerkki on synNotch-CAR-T-solumalli: kun synNotch sitoutuu antigeeniin A, se pilkkoutuu ja käynnistää kohdegeeninsä luennan sekä CAR-rakenteen tuotannon. Tämän jälkeen CAR siirtyy solukalvolle ja voi sitoutua esimerkiksi toiseen antigeeniin B, mikä aktivoi CAR-T-solun. Kuva tehty Biorender-ohjelmalla (biorender.com).

OR-logiikkaa on jo sovellettu hematologisten syöpien hoidoissa (105). Tässä lähestymistavassa CAR-T-soluja muokataan tunnistamaan kahta antigeeniä, jolloin vain toisenkin niistä tunnistaminen riittää CAR-T-solun aktivaatioon (Kuva 3A) (105). Antigeeniä tunnistavat rakenteet voivat olla kytkettynä kahteen eri CAR-rakenteeseen, jossa ne ilmentyvät solukalvolla rinnakkain (engl. dual-CAR), tai yhdessä yhdistetyssä CAR-rakenteessa, jossa ne ovat liitettynä peräkkäin linkkerin avulla (engl. tandem-CAR). Näillä menetelmillä on pystytty vastaamaan myös syöpäsolujen monimuotoisuuden ja antigeenisen katoamisen haasteisiin (106).

Kiinteiden kasvainten hoidoissa OR-logiikan soveltaminen on vaikeampaa, sillä niissä jo yhden täysin syöväälle ominaisen antigeenin löytäminen on ongelmallista. Kuitenkin monet kasvaimet yli-ilmentävät useita tuumoriassoituneita antigeenejä, jotka voivat esiintyä solupinnalla jopa klustereina (107). Tämä on johtanut tutkijoita kehittämään strategian, jossa hyödynnetään AND-

logiikka. Tällöin CAR-T-solut aktivoituvat vain, kun ne tunnistavat kaksi tai useampaa antigeeniä samanaikaisesti (Kuva 3B), millä voidaan saavuttaa parempi syöpäspesifisyys kuin vain yhden antigeenin ohjaamassa kohdesolun tuhoamisessa. Eräissä tutkimuksissa kehitettiin AND-logiikkaa noudattavia dual-CAR-T-soluja, jotka ksenograftimalleissa tunnistivat haiman syöpäsolujen karsinoembryonaalista antigeeniä (CEA) ja mesoteliiniä (MSLN) samanaikaisesti (108). Tutkimuksessa CAR-T-solut ilmensivät kahta CAR-rakennetta: CEA-CD3 ζ -CAR ja MSLN-4-1BB-CAR. Näissä CAR-T-soluissa signaalidomeeni CD3 ζ ja kostimulatorinen domeeni 4-1BB on jaettu kahteen eri CAR-rakenteeseen. Tämän dual-CAR strategian toimintaperiaate perustuu siihen, että tarkoituksenmukainen ja pitkäkestoinen hoitovaste edellyttää sekä signaalidomeenin että kostimulatorisen domeenin sitoutumista kohdeantigeneihinsä. Tämä strategia voi kuitenkin olla altis tahdottomalle aktivaatiolle, jos CD3 ζ -CAR-rakenne tunnistaa antigeenin terveessä kudoksessa. Kyseisessä tutkimuksessa kuitenkin havaittiin haittavaikutukset vähäisiksi (108).

Toinen AND-logiikkaa hyödyntävä strategia perustuu niin sanottuihin aviditeettipohjaisiin CAR-T-soluihin (109). Tässäkin mallissa CAR-T-solut muokataan tunnistamaan useita antigeeneja, mutta antigeeniä sitovien domeenien affiniteetti säädetään heikoksi. Lisäksi strategiassa pyritään estämään hallitsematonta CAR-rakenteiden välistä dimerisaatiota. Sen sijaan dimerisaatio pyritään indusoimaan kontrolloidusti ulkoisen molekyylin avulla. Spontaania dimerisaatiota voidaan estää korvaamalla saranarakenteen kysteiiniaminohapot seriiniaminohapoilla, sekä käyttämällä perinteisen scFv-rakenteen sijaan yksidomeenista proteiinia antigeenin tunnistuksessa. Näiden muutosten on havaittu estävän CAR-rakenteiden välistä klusteroitumista ja dimerisaatiota CAR-T-solujen pinnalla (109). Näin CAR-T-solut dimerisoituvat ja aktivoituvat vasta, kun ne tunnistavat kaikki kohdeantigeenit samanaikaisesti ja ulkoinen molekyyli on läsnä. Tällä tavoin on kehitetty entistä tarkemmin säädeltäviä ja tehokkaampia AND-logiikkaa hyödyntäviä CAR-T-soluja (109).

AND-logiikan ohella myös IF/THEN-logiikkaa on hyödynnetty CAR-T-solujen suunnittelussa (Kuva 3C) (72). Tässä lähestymistavassa CAR-rakenne aktivoituu tai tuodaan solukalvolle vain tietyn ehdon täytyessä. Esimerkiksi jos CAR-rakenteen antigeeniä sitovaan domeeniin lisätään sitoutumista estävä peptidiosa, pilkkoutuu se kasvainmikroympäristössä esiintyvien spesifien proteaasien vaikutuksesta, mikä johtaa CAR-T-solun aktivaatioon (110). Tällöin CAR-T-solujen sytotoksinen aktiivisuus rajoittuu vain kasvainympäristöön.

Toinen IF/THEN-logiikkaa hyödyntävä sekä erityistä huomiota saanut strategia CAR-T-soluissa on synteettisen Notch-reseptorijärjestelmän (synNotch) käyttö (Kuva 3C) (72). Kun synNotch-reseptori

CAR-T-solukalvolla tunnistaa kohdeproteiininsa, esimerkiksi syöpäsolun neoantigeenin, sen sisäinen osa vapautuu ja siirtyy tumaan. Siellä se käynnistää kohdegeenin ilmentymisen (111), johtaen CAR-rakenteen tuotantoon. Tämä CAR-rakenne voidaan muokata tunnistamaan jotakin toista syövän pinnalla esiintyvää antigeeniä. Näin synNotch-CAR-T-solu siis ilmentää pinnallaan CAR-rakennetta vasta syöpäsolun synNotch-välitteisen tunnistamisen jälkeen. Jos aktivoitunut synNotch-CAR-T-solu kulkeutuu pois kasvainalueelta, niin Notch-signaalointi lakkaa ja CAR-rakenteet poistuvat pian solukalvolta, jolloin myös sytotoksiset vaikutukset lakkaavat (112). Lisäksi SynNotch-piiri voidaan yhdistää myös OR-logiikkaan, jolloin voidaan tuottaa entistä spesifisempiä ja monimuotoisempaa syöpäsolukkoa tunnistavia CAR-T-soluja. Tässä lähestymistavassa CAR-rakenteen antigeeniä tunnistava domeeni voidaan suunnitella tunnistamaan useita antigeeneja esimerkiksi tandem-rakenteessa (112,113). Prekliinisissä tutkimuksissa synNotch-CAR-T-solujen on havaittu altistuvan vähemmän uupumukselle, toimivan tehokkaammin sekä vähentävän OTOT-haittavaikutuksia (112,113).

Toinen hyödyllinen näkökulma tähän strategiaan on, että synNotch-CAR-T-soluissa, jossa synNotch- ja CAR-rakenteet on kohdistettu eri antigeeneihin, ei näiden tarvitse olla samassa solussa, vaan riittää, että kyseiset antigeenit ovat samassa solukossa. Tällöin synNotch:n kohde voi olla myös jokin kudosspesifinen proteiini, eikä välttämättä syöpäspesifinen antigeeni. Näin mahdolliset OTOT-haittavaikutukset kohdistuvat korkeintaan samaan kudokseen, tai niitä ei ilmene lainkaan. Eräs tutkimusryhmä kehitti synNotch-CAR-T-soluja, jossa synNotch kohdennettiin solunulkoisesti esiintyvään keskuhermostospesifiseen proteoglykaaniin, brevicaniniin (BCAN) (114). BCAN:iin sitoutuessaan synNotch käynnisti tandem-CAR-rakenteen tuotannon. Tämä tandem-CAR oli suunniteltu tunnistamaan kahta glioblastoomaan (GBM) assosioituvaa antigeeniä: α -EphA2 ja IL13R α 2. Näitä kahta GBM-assosioituvaa antigeeniä esiintyy pienissä määrin myös muissa ihmisen terveissä kudoksissa, mutta ei lainkaan terveissä aivosoluissa. Tutkimuksessa havaittiin, että GBM-hiirimalleissa nämä BCAN-synNotch \rightarrow α -EphA2-IL13R α 2 CAR-T-solut aktivoituivat täysin kudosspesifisesti vain aivoissa, missä ne kykenivät tuhoamaan GBM-kasvaimet täysin ja ilman terveen kudoksen tuhoutumista (114).

Edellä mainittu strategia on kuitenkin haasteellisempi vaikeasti levinneissä kasvaimissa, jossa syöpäsoluja esiintyy useammissa kudoksissa. Lisäksi kiinteissä kasvaimissa esiintyy vain harvoin täysin spesifisiä antigeenejä, mikä on johtanut tutkijoita kehittämään strategian vastaamaan myös näihin haasteisiin. Kyseinen strategia perustuu synNotch-malliin, jossa hyödynnetään matala-affiniteettistä Notch-reseptoria (115). Tämä reseptori kykeni tunnistamaan HER2-antigeenia vain

silloin, kun sitä ilmentyi runsaasti, eli syöpäsoluissa. Se ei tunnistanut lainkaan terveitä soluja, joissa puolestaan esiintyi HER2-proteiinia vähemmissä määrin. Kun synNotch-reseptori sitoutui HER2 proteiiniin, T-solu alkoi tuottaa korkea-affiniteettista HER2-spesifistä CAR-rakennetta. Tämä HER2-CAR kykeni tunnistamaan myös ne syöpäsolut, jotka ilmensivät HER2-antigeeniä pienemmissä määrin. Näin saatiin aikaan erittäin herkkä, aktivaatiokynnykseen perustuva (engl. threshold-based) CAR-T-solu, jonka aktivaatio rajautui kasvainalueelle ja kykeni tunnistamaan varsin monimuotoista syöpäsolukkoa (115).

4.3 Farmakologinen lääkehoito CAR-T-hoidon tueksi ja haittavaikutusten estämiseksi

Tulevaisuudessa on tärkeää huomioida myös farmakologisten lähestymistapojen merkitystä CAR-T-hoidossa, sillä samanaikaisilla lääkehoidoilla voidaan tehostaa CAR-T-solujen toimintakykyä. Lääkkeiden yhdistäminen CAR-T-hoitoon on mahdollistanut esimerkiksi kasvainmikroympäristön muokkaamisen CAR-T-soluja suosivammaksi sekä hoidon kehittämisen entistä turvallisemmaksi. Esimerkiksi eräässä tutkimuksessa havaittiin, että FAP:n keskeisen säätelijäproteiinin, NADPH oksidaasi 4:n (NOX4) esto farmakologisesti vähensi fibroblastien pahanlaatuista erilaistumista CAF:ksi (116). NOX4 eston myötä myös osa CAF:sta palautui normaaliin terveeseen ilmiasuunsa, mikä paransi sytotoksisten T-solujen pääsyä CAF-solurikkaisiin kasvainalueisiin (116).

Haittavaikutusten ehkäisemiseksi tehokkaaksi menetelmäksi on noussut niin sanottujen itsemurhageenien lisääminen CAR-T-soluihin (117). Nämä geenit mahdollistavat CAR-T-solujen tuhoamisen tietyn molekyylin läsnä ollessa. Esimerkiksi indusoitava kaspasi 9-geeni (iCasp9) aktivoituu dimerisoitumalla, kun siihen sitoutuu AP1903-pienmolekyyli, mikä johtaa solujen nopeaan apoptoosiin (118). Näin ulkoisen molekyylin avulla voidaan aiheuttaa CAR-T-solujen apoptoottista solukuolemaa ja ehkäistä vakavia haittavaikutuksia. Tämän strategian haasteena on kuitenkin se, että kallis ja potilaalle tärkeä hoito keskeytyy välittömästi (117).

Tämä on johtanut tutkijoita kehittämään strategioita, joiden avulla CAR-T-solujen toimintaa voitaisiin väliaikaisesti keskeyttää ja aktivoida uudelleen haittavaikutusten väistyttyä. Hiljattain on havaittu, että jo kliiniseen käyttöön hyväksytty tyrosiinikinaasiestäjä dasatanib estää CAR-T-solujen aktivaatiota tilapäisesti (119). CAR-T-solujen signaloinnissa CD3ζ-domeenin ITAM-motiivit fosforyloituvat tyrosiinikinaasi LCK:n vaikutuksesta, mikä käynnistää signaalikaskadin. Edellä mainitussa tutkimuksessa todettiin, että dasatinib estää LCK:n aktiivisuutta palautuvasti, mikä keskeyttää signaloinnin tilapäisesti. Kun dasatanib ei enää ole läsnä, CAR-T-solujen toimintakyky

palautuu (119). Tämän ansiosta voidaan muodostaa eräänlainen ”on-off-kytkin” CAR-T-soluille. Prekliinisissä tutkimuksissa dasatinibin on havaittu estävän muun muassa vakavan CRS:n kehittymistä (119,120), mutta kliinisissä tutkimuksissa sitä ei ole vielä tutkittu.

5. Yhteenveto ja johtopäätökset

2000-luvulla kehitetty ja vuonna 2017 käyttöön otettu CAR-T-soluhoido on muodostunut tärkeäksi hoitomuodoksi B-solulähtöisten hematologisten syöpien hoidossa (8). Suurin osa syöivistä on kuitenkin peräisin kiinteistä kudoksista, eikä vastaavia CAR-T-hoitoja ole toistaiseksi vielä kehitetty niiden hoitoon. Hoitoa rajoittavat muun muassa helposti kohdennettavien pintarakenteiden puuttuminen, vaikea kasvainmikroympäristö, kasvainten monimuotoisuus sekä vakavat haittavaikutukset (45). Toisaalta nämä haasteet ovat johtaneet myös luoviin ratkaisuihin, joissa on kehitetty entistä älykkäämpiä CAR-T-soluja.

Yksi yleinen lähestymistapa CAR-T-solujen uupumisen ja haastavan kasvainmikroympäristön voittamiseksi on ollut niiden varustaminen uusilla toiminnallisuuksilla (engl. armoring) (94). Tällä tarkoitetaan geneettistä muokkausta siten, että ne kykenevät torjumaan kasvaimen aiheuttamaa immunosuppressiota, esimerkiksi hiljentämällä tiettyjä immuunijärjestelmän säätelygeenejä, kuten PD-1-geeniä (89). Näiden mallien avulla on saatu parempaa ymmärrystä siitä, miksi CAR-T-solujen toimintakyky on selvästi heikompaa kiinteiden kasvainten hoidossa sekä siitä, miten CAR-T-solut kykenevät sopeutumaan geneettisiin muutoksiin.

Huolimatta näistä edistysaskeleista, ehkä suurimpana esteenä turvallisen hoidon toteuttamiselle on edelleen syöpäspesifisten pintarakenteiden puuttuminen kiinteiden syöpäsolujen solupinnalla. Tämän vuoksi hoitoa on pyritty kohdentamaan tuumoriassosioituneisiin pintarakenteisiin, joita esiintyy kasvaimissa ylimäärin. Tällä strategialla on kuitenkin törmätty OTOT-haittavaikutuksiin, jossa kohderakenteita myös vähäisessä määrin ilmentävät terveet solut tuhoutuvat (72). Näiden haasteiden ylipääsemiseksi on muun muassa kehitetty älykkäämpiä niin kutsuttuja logiikkaohjattuja CAR-T-soluja (72). Näissä malleissa syöpäsolutunnistusta voidaan ohjata esimerkiksi monivaiheisesti, mikä on parantanut CAR-T-solujen spesifisyyttä ja toimintakykyä. Prekliinisissä tutkimuksissa erityisesti IF/THEN-logiikkaa ja OR-logiikkaa noudattavat CAR-T-solut ovat osoittaneet merkittävästi vähemmän OTOT-haittavaikutuksia sekä pitkäaikaisempaa säilymistä (112,121).

Kaiken kaikkiaan nämä uudet lähestymistavat kuulostavat lupaavilta, mutta niiden kliininen soveltaminen vaatii vielä paljon tutkimusta. Tämän vuoksi on tärkeää myös pohtia, miten nykyistä lääketieteellistä tietämystä voidaan hyödyntää CAR-T-hoidon tueksi. Farmakologisen lääkehoidon soveltaminen CAR-T-hoidon tukemiseksi on osoittautunut hyödylliseksi useissa tutkimuksissa. Esimerkiksi NOX4-inhibitiolla on pystytty muokkaamaan kasvainmikroympäristöä CAR-T-soluille edullisemmaksi ja dasatinibillä on kyetty väliaikaisesti estää CAR-T-solujen toiminnan, parantaen näin hoidon tehokkuutta ja turvallisuutta (116,119).

Lopuksi voidaan todeta, että menestyksekkäät immunoterapeuttiset CAR-T-hoitovasteet hematologisten syöpien hoidossa, sekä jatkuvasti kasvava ymmärrys CAR-T-solujen toiminnasta, luovat vahvan pohjan hoidon laajentamiselle myös kiinteiden syöpien hoitoon. Tämä kuitenkin vaatii vielä paljon tasapainottelua useiden biologisten, teknisten sekä kliinisten tekijöiden välillä, minkä vuoksi tarvitaan vielä runsaasti tutkimusta näiden tavoitteiden saavuttamiseksi.

Lähdeluettelo

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024 May;74(3):229–63.
2. Smyth MJ, Teng MWL. 2018 Nobel Prize in physiology or medicine. Vol. 7, *Clinical and Translational Immunology*. John Wiley and Sons Inc.; 2018.
3. Najafi M, Majidpoor J, Toolee H, Mortezaee K. The current knowledge concerning solid cancer and therapy. Vol. 35, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. John Wiley and Sons Inc; 2021.
4. Parish CR. Cancer immunotherapy: The past, the present and the future. Vol. 81, *Immunology and Cell Biology*. 2003. p. 106–13.
5. Grillo-López AJ, White CA, Dallaire BK, Varns CL, Shen CD, Wei A, et al. Rituximab: The First Monoclonal Antibody Approved for the Treatment of Lymphoma. Vol. 1, *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2000.
6. Swain SM, Shastry M, Hamilton E. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. Vol. 22, *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Research; 2023. p. 101–26.
7. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2011 Aug 25;365(8):725–33.
8. Feins S, Kong W, Williams EF, Milone MC, Fraietta JA. An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. Vol. 94, *American Journal of Hematology*. Wiley-Liss Inc.; 2019. p. S3–9.
9. Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, Nasta SD, Mato AR, Anak Ö, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *New England Journal of Medicine*. 2017 Dec 28;377(26):2545–54.
10. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2017 Dec 28;377(26):2531–44.
11. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2014 Oct 16;371(16):1507–17.
12. Sun D, Shi X, Li S, Wang X, Yang X, Wan M. CAR-T cell therapy: A breakthrough in traditional cancer treatment strategies (Review). *Mol Med Rep*. 2024 Mar 1;29(3).
13. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. Vol. 11, *Blood Cancer Journal*. Springer Nature; 2021.
14. Hanssens H, Meeus F, De Veirman K, Breckpot K, Devoogdt N. The antigen-binding moiety in the driver’s seat of CARs. Vol. 42, *Medicinal Research Reviews*. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 306–42.
15. Arslan M, Karadag M, Onal E, Gelinci E, Cakan-Akdogan G, Kalyoncu S. Effect of non-repetitive linker on in vitro and in vivo properties of an anti-VEGF scFv. *Sci Rep*. 2022 Dec 1;12(1).

16. Crivianu-Gaita V, Thompson M. Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. Vol. 85, *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier Ltd; 2016. p. 32–45.
17. Chmielewski M, Hombach AA, Abken H. Antigen-specific T-cell activation independently of the MHC: Chimeric antigen receptor-redirected T cells. *Front Immunol*. 2013;4(NOV).
18. Jayaraman J, Melody MP, Hou AJ, Desai RP, Fung AW, Pham AHT, et al. CAR-T design: Elements and their synergistic function. Vol. 58, *EBioMedicine*. Elsevier B.V.; 2020.
19. Fujiwara K, Tsunei A, Kusabuka H, Ogaki E, Tachibana M, Okada N. Hinge and transmembrane domains of chimeric antigen receptor regulate receptor expression and signaling threshold. *Cells*. 2020 May 1;9(5).
20. Zhang A, Sun Y, Du J, Dong Y, Pang H, Ma L, et al. Reducing Hinge Flexibility of CAR-T Cells Prolongs Survival In Vivo With Low Cytokines Release. *Front Immunol*. 2021 Oct 5;12.
21. Wilkie S, Picco G, Foster J, Davies DM, Julien S, Cooper L, et al. Retargeting of Human T Cells to Tumor-Associated MUC1: The Evolution of a Chimeric Antigen Receptor 1 [Internet]. Vol. 180, *The Journal of Immunology*. 2008. Available from: <http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/180/7/4901/1259346/zim00708004901.pdf>
22. Taheri FH, Hassani M, Sharifzadeh Z, Behdani M, Abdoli S, Sayadi M, et al. Tuning spacer length improves the functionality of the nanobody-based VEGFR2 CAR T cell. *BMC Biotechnol*. 2024 Dec 1;24(1).
23. Hombach A, Hombach AA, Abken H. Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: Modification of the IgG1 Fc spacer domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids off-target activation and unintended initiation of an innate immune response. *Gene Ther*. 2010 Oct;17(10):1206–13.
24. Gu A, Bai Y, Zhang C, Xu C, An Z, Zhang Y, et al. IL13R α 2-targeted third-generation CAR-T cells with CD28 transmembrane domain mediate the best anti-glioblastoma efficacy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2023 Jul 1;72(7):2393–403.
25. Alabanza L, Pegues M, Geldres C, Shi V, Wiltzius JJW, Sievers SA, et al. Function of Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptors with Human Variable Regions Is Affected by Hinge and Transmembrane Domains. *Molecular Therapy*. 2017 Nov 1;25(11):2452–65.
26. Rafiq S, Hackett CS, Brentjens RJ. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. Vol. 17, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Research; 2020. p. 147–67.
27. Salter AI, Rajan A, Kennedy JJ, Ivey RG, Shelby SA, Leung I, et al. Comparative analysis of TCR and CAR signaling informs CAR designs with superior antigen sensitivity and in vivo function. *Sci Signal*. 2021 Aug 24;14(697).
28. Bocker T, Karjalainen K. Signals through T Cell Receptor- ζ Chain Alone Are Insufficient to Prime Resting T Lymphocytes.
29. Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, et al. Differential T Cell Costimulatory Requirements in CD28-Deficient Mice The B7 molecule, constitutively ex-pressed on dendritic cells (12), is also ex-pressed on other APCs and B cells and is [Internet]. Available from: <https://www.science.org>
30. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Rivière I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR ζ /CD28 receptor [Internet]. 2002. Available from: <http://biotech.nature.com>

31. Kawalekar OU, O'Connor RS, Fraietta JA, Guo L, McGettigan SE, Posey AD, et al. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity*. 2016 Feb 16;44(2):380–90.
32. Van Der Stegen SJC, Hamieh M, Sadelain M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. Vol. 14, *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group; 2015. p. 499–509.
33. Tokarew N, Ogonek J, Endres S, von Bergwelt-Baildon M, Kobold S. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells. Vol. 120, *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group; 2019. p. 26–37.
34. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of t cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular Therapy*. 2010 Apr;18(4):843–51.
35. Abate-Daga D, Lagisetty KH, Tran E, Zheng Z, Gattinoni L, Yu Z, et al. A novel chimeric antigen receptor against prostate stem cell antigen mediates tumor destruction in a humanized mouse model of pancreatic cancer. *Hum Gene Ther*. 2014 Dec 1;25(12):1003–12.
36. Goyco Vera D, Waghela H, Nuh M, Pan J, Lulla P. Approved CAR-T therapies have reproducible efficacy and safety in clinical practice. *Hum Vaccin Immunother*. 2024 Dec 31;20(1):2378543.
37. Nadler LM, Anderson KC, Marti G, Bates M, Park E, Daley JF, et al. B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. *J Immunol*. 1983 Jul;131(1):244–50.
38. Scheuermann RH, Racila E. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. *Leuk Lymphoma*. 1995;18(5–6):385–97.
39. Shah N, Chari A, Scott E, Mezzi K, Usmani SZ. B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches. Vol. 34, *Leukemia*. Springer Nature; 2020. p. 985–1005.
40. Kochenderfer JN, Rosenberg SA. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. Vol. 10, *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2013. p. 267–76.
41. Cappell KM, Sherry RM, Yang JC, Goff SL, Vanasse DA, McIntyre L, et al. Long-Term Follow-Up of Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *J Clin Oncol* [Internet]. 2020;38:3805–15. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2019.41.15.2805>.
42. Xiao W, Salem D, McCoy CS, Lee D, Shah NN, Stetler-Stevenson M, et al. Early recovery of circulating immature B cells in B-lymphoblastic leukemia patients after CD19 targeted CAR T cell therapy: A pitfall for minimal residual disease detection. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018 May 1;94(3):434–43.
43. Potnis KC, Di M, Isufi I, Gowda L, Seropian SE, Foss FM, et al. Cost-effectiveness of chimeric antigen receptor T-cell therapy in adults with relapsed or refractory follicular lymphoma. *Blood Adv*. 2023 Mar 14;7(5):801–10.
44. Wittling MC, Cole AC, Brammer B, Diatkar KG, Schmitt NC, Paulos CM. Strategies for Improving CAR T Cell Persistence in Solid Tumors. Vol. 16, *Cancers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
45. Albelda SM. CAR T cell therapy for patients with solid tumours: key lessons to learn and unlearn. *Nat Rev Clin Oncol*. 2024 Jan 1;21(1):47–66.

46. Mueller KT, Chakraborty A, Wood PA, Awasthi R, Quintas-Cardama A, Han X, et al. Cellular Kinetics of Chimeric Antigen Receptor T Cells (CTL019) in Patients with Relapsed/Refractory CD19+ Leukemia. *Blood*. 2016 Dec 2;128(22):220–220.
47. Melenhorst JJ, Chen GM, Wang M, Porter DL, Chen C, Collins MKA, et al. Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4+ CAR T cells. *Nature*. 2022 Feb 17;602(7897):503–9.
48. Vignali D, Kallikourdis M. Improving homing in T cell therapy. Vol. 36, *Cytokine and Growth Factor Reviews*. Elsevier Ltd; 2017. p. 107–16.
49. Ziemer LS, Koch CJ, Maity A, Magarelli DP, Horan AM, Evans SM. Hypoxia and VEGF mRNA Expression in Human Tumors 1 [Internet]. Available from: www.nature.com/neo
50. Ribatti D. Immunosuppressive effects of vascular endothelial growth factor (Review). Vol. 24, *Oncology Letters*. Spandidos Publications; 2022.
51. Wachholz GE, Akbari P, Huijbers EJM, Jalan P, van Beijnum JR, Griffioen AW. Targeting endothelial cell anergy to improve CAR T cell therapy for solid tumors. Vol. 1879, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Elsevier B.V.; 2024.
52. Foeng J, Comerford I, McColl SR. Harnessing the chemokine system to home CAR-T cells into solid tumors. Vol. 3, *Cell Reports Medicine*. Cell Press; 2022.
53. Oldham KA, Parsonage G, Bhatt RI, Wallace DMA, Deshmukh N, Chaudhri S, et al. T lymphocyte recruitment into renal cell carcinoma tissue: A role for chemokine receptors CXCR3, CXCR6, CCR5, and CCR6. *Eur Urol*. 2012 Feb;61(2):385–94.
54. Berghuis D, Santos SJ, Baelde HJ, Taminiau AHM, Maarten Egeler R, Schilham MW, et al. Pro-inflammatory chemokine-chemokine receptor interactions within the Ewing sarcoma microenvironment determine CD8+ T-lymphocyte infiltration and affect tumour progression. *Journal of Pathology*. 2011 Feb;223(3):347–57.
55. Peng D, Kryczek I, Nagarsheth N, Zhao L, Wei S, Wang W, et al. Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy. *Nature*. 2015 Nov 12;527(7577):249–53.
56. Weenink B, Draaisma K, Ooi HZ, Kros JM, Sillevius Smitt PAE, Debets R, et al. Low-grade glioma harbors few CD8 T cells, which is accompanied by decreased expression of chemo-attractants, not immunogenic antigens. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).
57. Valkenburg KC, De Groot AE, Pienta KJ. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. Vol. 15, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 366–81.
58. Hou AJ, Chen LC, Chen YY. Navigating CAR-T cells through the solid-tumour microenvironment. Vol. 20, *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Research; 2021. p. 531–50.
59. Chakravarthy A, Khan L, Bensler NP, Bose P, De Carvalho DD. TGF- β -associated extracellular matrix genes link cancer-associated fibroblasts to immune evasion and immunotherapy failure. *Nat Commun*. 2018 Dec 1;9(1).
60. Liu Z, Zhou Z, Dang Q, Xu H, Lv J, Li H, et al. Immunosuppression in tumor immune microenvironment and its optimization from CAR-T cell therapy. Vol. 12, *Theranostics*. Ivyspring International Publisher; 2022. p. 6273–90.
61. Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41571->

62. Sayour EJ, McLendon P, McLendon R, De Leon G, Reynolds R, Kresak J, et al. Increased proportion of FoxP3+ regulatory T cells in tumor infiltrating lymphocytes is associated with tumor recurrence and reduced survival in patients with glioblastoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2015 Mar 22;64(4):419–27.
63. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 2004 Sep;10(9):942–9.
64. Cadilha BL, Benmebarek MR, Dorman K, Oner A, Lorenzini T, Obeck H, et al. Combined tumor-directed recruitment and protection from immune suppression enable CAR T cell efficacy in solid tumors. Vol. 7, *Sci. Adv*. 2021.
65. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. Vol. 877, *European Journal of Pharmacology*. Elsevier B.V.; 2020.
66. Yeung OWH, Lo CM, Ling CC, Qi X, Geng W, Li CX, et al. Alternatively activated (M2) macrophages promote tumour growth and invasiveness in hepatocellular carcinoma.
67. Chen X, Yang S, Li S, Qu Y, Wang HY, Liu J, et al. Secretion of bispecific protein of anti-PD-1 fused with TGF- β trap enhances antitumor efficacy of CAR-T cell therapy. *Mol Ther Oncolytics*. 2021 Jun 25;21:144–57.
68. Lasser SA, Ozbay Kurt FG, Arkhypov I, Utikal J, Umansky V. Myeloid-derived suppressor cells in cancer and cancer therapy. Vol. 21, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Springer Nature; 2024. p. 147–64.
69. Abdalsalam NMF, Ibrahim A, Saliu MA, Liu TM, Wan X, Yan D. MDSC: a new potential breakthrough in CAR-T therapy for solid tumors. *Cell Commun Signal [Internet]*. 2024 Dec 19;22(1):612. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39702149>
70. Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res*. 2006 Jan 15;66(2):1123–31.
71. Beury DW, Parker KH, Nyandjo M, Sinha P, Carter KA, Ostrand-Rosenberg S. Cross-talk among myeloid-derived suppressor cells, macrophages, and tumor cells impacts the inflammatory milieu of solid tumors. *J Leukoc Biol*. 2014 Dec;96(6):1109–18.
72. Flugel CL, Majzner RG, Krenciute G, Dotti G, Riddell SR, Wagner DL, et al. Overcoming on-target, off-tumour toxicity of CAR T cell therapy for solid tumours. Vol. 20, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Springer Nature; 2023. p. 49–62.
73. Yan M, Schwaederle M, Arguello D, Millis SZ, Gatalica Z, Kurzrock R. HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2015 Mar 1;34(1):157–64.
74. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of t cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular Therapy*. 2010 Apr;18(4):843–51.
75. Xie N, Shen G, Gao W, Huang Z, Huang C, Fu L. Neoantigens: promising targets for cancer therapy. Vol. 8, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2023.
76. Lin H, Yang X, Ye S, Huang L, Mu W, Lin H, et al. Antigen escape in CAR-T cell therapy: Mechanisms and overcoming strategies. Vol. 178, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson s.r.l.; 2024.

77. Morris EC, Neelapu SS, Giavridis T, Sadelain M. Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. Vol. 22, *Nature Reviews Immunology*. Nature Research; 2022. p. 85–96.
78. Choi BD, Gerstner ER, Frigault MJ, Leick MB, Mount CW, Balaj L, et al. Intraventricular CARv3-TEAM-E T Cells in Recurrent Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2024 Apr 11;390(14):1290–8.
79. Del Bufalo F, De Angelis B, Caruana I, Del Baldo G, De Ioris MA, Serra A, et al. GD2-CART01 for Relapsed or Refractory High-Risk Neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2023 Apr 6;388(14):1284–95.
80. Gust J, Hay KA, Hanafi LA, Li D, Myerson D, Gonzalez-Cuyar LF, et al. Endothelial activation and blood–brain barrier disruption in neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CD19 CAR-T cells. *Cancer Discov*. 2017 Dec 1;7(12):1404–19.
81. Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, Ghobadi A, Turtle CJ, Brudno JN, et al. ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. Vol. 25, *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. Elsevier Inc.; 2019. p. 625–38.
82. Tay SH, Toh MMX, Thian YL, Vellayappan BA, Fairhurst AM, Chan YH, et al. Cytokine Release Syndrome in Cancer Patients Receiving Immune Checkpoint Inhibitors: A Case Series of 25 Patients and Review of the Literature. *Front Immunol*. 2022 Jan 28;13.
83. Le RQ, Li L, Yuan W, Shord SS, Nie L, Habtemariam BA, et al. FDA Approval Summary: Tocilizumab for Treatment of Chimeric Antigen Receptor T Cell-Induced Severe or Life-Threatening Cytokine Release Syndrome. *Oncologist*. 2018 Aug 1;23(8):943–7.
84. Zhang Y, Zhou F, Wu Z, Li Y, Li C, Du M, et al. Timing of Tocilizumab Administration Under the Guidance of IL-6 in CAR-T Therapy for R/R Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Immunol*. 2022 Jun 21;13.
85. Liu G, Rui W, Zheng H, Huang D, Yu F, Zhang Y, et al. CXCR2-modified CAR-T cells have enhanced trafficking ability that improves treatment of hepatocellular carcinoma. *Eur J Immunol*. 2020 May 1;50(5):712–24.
86. Dong X, Ren J, Amoozgar Z, Lee S, Datta M, Roberge S, et al. Anti-VEGF therapy improves EGFR-vIII-CAR-T cell delivery and efficacy in syngeneic glioblastoma models in mice. *J Immunother Cancer*. 2023 Mar 10;11(3).
87. Song P, Zhang Q, Xu Z, Shi Y, Jing R, Luo D. CRISPR/Cas-based CAR-T cells: production and application. Vol. 12, *Biomarker Research*. BioMed Central Ltd; 2024.
88. Tang N, Cheng C, Zhang X, Qiao M, Li N, Mu W, et al. TGF- β inhibition via CRISPR promotes the long-term efficacy of CAR T cells against solid tumors. *JCI Insight*. 2020 Feb 27;5(4).
89. Rupp LJ, Schumann K, Roybal KT, Gate RE, Ye CJ, Lim WA, et al. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-Tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).
90. Wei J, Luo C, Wang Y, Guo Y, Dai H, Tong C, et al. PD-1 silencing impairs the anti-tumor function of chimeric antigen receptor modified T cells by inhibiting proliferation activity. *J Immunother Cancer*. 2019 Aug 7;7(1).
91. Dötsch S, Svec M, Schober K, Hammel M, Wanisch A, Gökmen F, et al. Long-term persistence and functionality of adoptively transferred antigen-specific T cells with genetically ablated PD-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023 Mar 7;120(10).

92. Kloss CC, Lee J, Zhang A, Chen F, Melenhorst JJ, Lacey SF, et al. Dominant-Negative TGF- β Receptor Enhances PSMA-Targeted Human CAR T Cell Proliferation And Augments Prostate Cancer Eradication. *Molecular Therapy*. 2018 Jul 5;26(7):1855–66.
93. Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, Feng Y, Dimitrov DS, Jones DR, et al. Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. *Journal of Clinical Investigation*. 2016 Aug 1;126(8):3130–44.
94. Carcopino C, Erdogan E, Henrich M, Kobold S. Armoring chimeric antigen receptor (CAR) T cells as micropharmacies for cancer therapy. *Immuno-Oncology and Technology*. Elsevier Inc.; 2024.
95. Caruana I, Savoldo B, Hoyos V, Weber G, Liu H, Kim ES, et al. Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirection T lymphocytes. *Nat Med*. 2015 May 1;21(5):524–9.
96. Liu Y, Sun Y, Wang P, Li S, Dong Y, Zhou M, et al. FAP-targeted CAR-T suppresses MDSCs recruitment to improve the antitumor efficacy of claudin18.2-targeted CAR-T against pancreatic cancer. *J Transl Med*. 2023 Dec 1;21(1).
97. Wang LCS, Lo A, Scholler J, Sun J, Majumdar RS, Kapoor V, et al. Targeting fibroblast activation protein in tumor stroma with chimeric antigen receptor T cells can inhibit tumor growth and augment host immunity without severe toxicity. *Cancer Immunol Res*. 2014 Feb 1;2(2):154–66.
98. Roberts EW, Deonarine A, Jones JO, Denton AE, Feig C, Lyons SK, et al. Depletion of stromal cells expressing fibroblast activation protein- α from skeletal muscle and bone marrow results in cachexia and anemia. *Journal of Experimental Medicine*. 2013 Jun;210(6):1137–51.
99. Olivera I, Etxeberria I, Luri-Rey C, Molero-Glez P, Melero I. Regional and intratumoral adoptive T-cell therapy. Vol. 24, *Immuno-Oncology and Technology*. Elsevier Inc.; 2024.
100. Adusumilli PS, Cherkassky L, Villena-Vargas J, Colovos C, Servais E, Plotkin J, et al. Regional delivery of mesothelin-targeted CAR T cell therapy generates potent and long-lasting CD4-dependent tumor immunity. *Sci Transl Med*. 2014 Nov 5;6(261).
101. Theruvath J, Sotillo E, Mount CW, Graef CM, Delaidelli A, Heitzeneder S, et al. Locoregionally administered B7-H3-targeted CAR T cells for treatment of atypical teratoid/rhabdoid tumors. *Nat Med*. 2020 May 1;26(5):712–9.
102. Tchou J, Zhao Y, Levine BL, Zhang PJ, Davis MM, Melenhorst JJ, et al. Safety and efficacy of intratumoral injections of chimeric antigen receptor (CAR) T cells in metastatic breast cancer. *Cancer Immunol Res*. 2017 Dec 1;5(12):1152–61.
103. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, et al. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *New England Journal of Medicine*. 2016 Dec 29;375(26):2561–9.
104. Flugel CL, Majzner RG, Krenciute G, Dotti G, Riddell SR, Wagner DL, et al. Overcoming on-target, off-tumour toxicity of CAR T cell therapy for solid tumours. Vol. 20, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Springer Nature; 2023. p. 49–62.
105. Yang J, Guo H, Han L, Song Y, Zhou K. Dual-targeted CAR T-cell immunotherapies for hematological malignancies: latest updates from the 2023 ASH annual meeting. Vol. 13, *Experimental Hematology and Oncology*. BioMed Central Ltd; 2024.
106. Ruella M, Barrett DM, Kenderian SS, Shestova O, Hofmann TJ, Perazzelli J, et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *Journal of Clinical Investigation*. 2016 Oct 3;126(10):3814–26.

107. Wollman AJM, Fournier C, Llorente-Garcia I, Harriman O, Payne-Dwyer AL, Shashkova S, et al. Critical roles for EGFR and EGFR-HER2 clusters in EGF binding of SW620 human carcinoma cells. *J R Soc Interface*. 2022;19(190):34–74.
108. Zhang E, Yang P, Gu J, Wu H, Chi X, Liu C, et al. Recombination of a dual-CAR-modified T lymphocyte to accurately eliminate pancreatic malignancy. *J Hematol Oncol*. 2018 Aug 13;11(1).
109. Salzer B, Schueller CM, Zajc CU, Peters T, Schoeber MA, Kovacic B, et al. Engineering AvidCARs for combinatorial antigen recognition and reversible control of CAR function. *Nat Commun*. 2020 Dec 1;11(1).
110. Han X, Bryson PD, Zhao Y, Cinay GE, Li S, Guo Y, et al. Masked Chimeric Antigen Receptor for Tumor-Specific Activation. *Molecular Therapy*. 2017 Jan 4;25(1):274–84.
111. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science (1979)*. 1999 Apr 30;284(5415):770–6.
112. Choe JH, Watchmaker PB, Simic MS, Gilbert RD, Li AW, Krasnow NA, et al. SynNotch-CAR T cells overcome challenges of specificity, heterogeneity, and persistence in treating glioblastoma. *Sci Transl Med*. 2021 Apr 28;13(591).
113. Lim WA, Mc U. Engineered SH3-Derived Sherpabodies Function as a Modular Platform for Targeted T Cell Immunotherapy 2 3. 2240; Available from: <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/doi/10.1158/0008-5472.CAN-24-1959/3547961/can-24-1959.pdf>
114. Simic MS, Watchmaker PB, Gupta S, Wang Y, Sagan SA, Duecker J, et al. Programming tissue-sensing T cells that deliver therapies to the brain. *Science*. 2024 Dec 6;386(6726):eadl4237.
115. Hernandez-Lopez RA, Yu W, Cabral KA, Creasey OA, del Pilar Lopez Pazmino M, Tonai Y, et al. T cell circuits that sense antigen density with an ultrasensitive threshold. *Science (1979)*. 2021 Mar 12;371(6534):1166–71.
116. Ford K, Hanley CJ, Mellone M, Szyndralewicz C, Heitz F, Wiesel P, et al. NOX4 inhibition potentiates immunotherapy by overcoming cancer-associated fibroblast-mediated CD8 T-cell exclusion from tumors. *Cancer Res*. 2020 May 1;80(9):1846–60.
117. Russell GC, Hamzaoui Y, Rho D, Sutrave G, Choi JS, Missan DS, et al. Synthetic biology approaches for enhancing safety and specificity of CAR-T cell therapies for solid cancers. *Cytotherapy*. 2024 Aug 1;26(8):842–57.
118. Straathof KC, Pulè MA, Yotnda P, Dotti G, Vanin EF, Brenner MK, et al. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*. 2005 Jun 1;105(11):4247–54.
119. Mestermann K, Giavridis T, Weber J, Rydzek J, Frenz S, Nerreter T, et al. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib acts as a pharmacologic on/off switch for CAR T cells. *Sci Transl Med*. 2019 Jul 3;11(499).
120. Weber EW, Lynn RC, Sotillo E, Lattin J, Xu P, Mackall CL. Pharmacologic control of CAR-T cell function using dasatinib. *Blood Adv*. 2019 Mar 12;3(5):711–7.
121. Lim WA, Mc U. Engineered SH3-Derived Sherpabodies Function as a Modular Platform for Targeted T Cell Immunotherapy 2 3. 2240; Available from: <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/doi/10.1158/0008-5472.CAN-24-1959/3547961/can-24-1959.pdf>