

EFFICACIA E SICUREZZA DELLA TERAPIA CON CELLULE CAR-T

A cura del Dott. Luigi Iannone

La terapia con linfociti T ingegnerizzati è un tipo di trattamento in cui le cellule immunitarie del paziente, prelevate dal sangue periferico, vengono modificate in laboratorio con l'aggiunta di un gene che esprime uno specifico recettore per consentire alle cellule T la possibilità di legarsi a specifici target proteici tumorali; questo recettore è noto come *chimeric antigen receptor* (CAR)¹. I recettori sono chimerici in quanto combinano sia il sito di legame dell'antigene che le funzioni attivanti le cellule T in un unico recettore. Un grande numero di cellule CAR-T è così prodotto in laboratorio e somministrate al paziente tramite infusione. Questa terapia è stata testata in ambito oncologico e recentemente approvata negli Stati Uniti ed in Europa per il trattamento del linfoma a cellule B (BLBCL) e della leucemia linfoblastica acuta (ALL)².

PREPARAZIONE E PROCEDURA DI INFUSIONE

Le cellule CAR-T possono derivare sia dal sangue del paziente stesso (autologhe) che da un donatore sano (allogeniche). Una volta isolate le cellule T sono ingegnerizzate, come detto, per esprimere uno specifico CAR che permette alle stesse di avere come target specifici antigeni espressi su cellule tumorali. Dopo l'infusione, permangono nel circolo ematico, comportandosi come un farmaco³. Quando entrano in contatto con l'antigene specifico per le quali sono programmate, le cellule CAR-T si legano e si attivano, proliferano e diventano citotossiche. Le cellule CAR-T agiscono in vari modi: aumentano la citotossicità attraverso la proliferazione cellulare e causando la secrezione di fattori che possono danneggiare le altre cellule come citochine, interleuchine e fattori di crescita⁴. Il primo *step* nella somministrazione delle CAR-T nel paziente è la rimozione dei linfociti attivati nel sangue con un processo chiamato aferesi leucocitaria; il prodotto dell'aferesi viene poi trasferito nel *processing-center* cellulare ed i linfociti T-specifici sono attivati in un ambiente nel quale possono proliferare ed essere attivati dall'interleuchina 2 (IL-2) ed anticorpi anti-CD3. Successivamente le cellule T sono transfettate con i geni CD19-CAR attraverso vettori retro o lentivirali, completamente sicuri per via della parziale delezione della regione U3. I pazienti vanno poi incontro a chemioterapia linfo-depletiva prima dell'infusione con le CAR-T⁵⁻⁷. Negli ultimi anni, l'immunoterapia con i CAR-T si è sviluppata rapidamente ed è considerata promettente. Sono stati fatti numerosi sforzi per migliorare l'efficacia delle terapie *CAR-based*, come il miglioramento delle strutture delle cellule CAR-T, compreso lo sviluppo di recettori di riconoscimento dell'antigene extracellulare, molecole co-stimolanti intracellulari e l'applicazione combinata di CAR e piccole molecole sintetiche. Inoltre, sono stati studiati gli effetti sulla funzione delle cellule CAR-T della distanza spaziale tra i CAR ed i

target antigenici tumorali. Questo articolo si focalizzerà sull'efficacia, la sicurezza e le strategie di progettazione delle cellule CAR-T.

CAR-T IN ONCOLOGIA

Oggi il rischio di sviluppare il cancro è piuttosto alto ed il numero di pazienti con tumore è in costante aumento e se tale fenomeno non viene rallentato è previsto che l'incidenza raggiungerà i 15 milioni entro il 2020⁸. Come trattamento antitumorale, l'emergere della terapia con i CAR ha portato nuove speranze per i pazienti oncologici e nel mondo scientifico. Le cellule CAR-T possono avere come target antigeni tumorali, indipendentemente dalla restrizione MHC, sono formate da un dominio di legame extracellulare, una porzione trans-membrana ed un dominio di segnalazione intracellulare che è molto importante per l'attivazione completa di queste cellule^{9,10}. Al riconoscimento di specifici antigeni, le cellule CAR-T si attivano, proliferano e secernono citochine. Nonostante l'efficacia dimostrata in ambito onco-ematologico, il trattamento dei tumori solidi con CAR-T è ancora insoddisfacente ed un insieme di sfide non è ancora risolto, come l'antigene-specificità, i meccanismi di esaurimento dell'efficacia ed i problemi di sicurezza⁵. L'identificazione dei target è un prerequisito della terapia cellulare CAR-T; per evitare il danno ai tessuti sani causato dalla terapia cellulare CAR-T, i target devono essere limitati alle cellule tumorali. Perciò, una varietà di antigeni tumorali associati (TAA) sono stati identificati come obiettivo ideale dell'effetto terapeutico^{4,5}.

ONCOEMATOLOGIA

Negli ultimi anni, sono stati effettuati numerosi trial clinici sui CAR-T nelle neoplasie ematologiche; ad esempio, CAR-T contro il CD19 per trattare i tumori delle cellule B hanno un tasso di risposta antitumorale fino al 70% -90% in acuto ed in cronico¹¹. Nonostante il grande successo con CAR specifiche per CD19, cellule con varianti *escape* del CD19 sono state identificate dopo la terapia e pazienti inizialmente *responders*, in seguito alla perdita del target avevano una ricaduta. Un metodo per superare i problemi relativi all'*escape* dell'antigene è ricercare altri target tumorali specifici, come CD22, CD20, CD138, CD33, CD123, il recettore della proteina tirosin-chinasi ROR1 (ROR1), la catena dell'immunoglobulina kappa (Igκ), l'antigene di maturazione delle cellule B (BCMA) e l'antigene Lewis Y (LeY)^{6,7,10}. Altri metodi per superare i problemi relativi all'*escape* sono sviluppare recettori chimerici bi-specifici CAR-T; per esempio, la progettazione di cellule T con target CD19/CD20 accoppiati potrebbero distruggere le cellule tumorali efficientemente incontrando anche uno solo dei due antigeni^{3,12}. Oltre all'*escape* CD19, la mancanza di HVEM (*Herpes Virus Entry Mediator*) è stata anche segnalata come causa di linfomi in vivo dovuti alla distruzione delle interazioni

inibitorie tra i recettori HVEM e BTLA (linfociti B e T attenuatori). Le cellule CAR-T progettate per secernere HVEM hanno dimostrato una grande efficacia contro i linfomi xeno-trapiantati in vivo e con i risultati confortanti dei CAR CD19 si è cercato di sviluppare nuovi metodi efficaci per trattare con successo i tumori solidi^{3,10,13,14}. Oltre ai trial sulle patologie onco-ematologiche, molti antigeni sono stati identificati come target per garantire un'efficacia ottimale anche per i tumori solidi.

TUMORI SOLIDI

L'espressione di EGFRvIII all'interno di una cellula è spesso associata alla sopravvivenza, all'invasione, all'angiogenesi ed alla resistenza a radio ed a chemioterapia. Cellule CAR-T specifiche per l'EGFRvIII hanno dimostrato una grande efficacia antitumorale negli studi preclinici e ora sono in corso di valutazione in studi clinici^{15,16}. Il recettore $\alpha 2$ (IL13R $\alpha 2$) dell'interleuchina 13 è un antigene glioma-associato e relato ad un ridotto tasso di sopravvivenza dei pazienti; in uno studio, dopo trattamento con cellule CAR-T, è stata osservata la regressione dei tumori con corrispondente incremento delle citochine e delle cellule immunitarie. Comunque specifici CAR per l'IL13R $\alpha 2$ possono riconoscere il recettore 13 dell'interleuchina (IL13R $\alpha 1$) e per risolvere il problema, il frammento variabile a catena singola (*scFv*) specifico dell'IL13R $\alpha 2$ è stato usato come dominio specifico di legame dell'antigene e questa fine specificità ha infatti potenziato la terapia¹⁷⁻¹⁹. La specificità può anche essere incrementata con i CAR aventi come target due o più antigeni. Sono stati progettati specifici CAR con target IL13R $\alpha 2$ ed il recettore 2 del fattore di crescita epidermico umano (HER-2) con domini CD3z e CD28 per formare CAR tandem (*tanCAR*)²⁰. Queste cellule CAR-T possono riconoscere distintamente ed efficacemente i tumori, diminuire l'*escape* dell'antigene e migliorare la persistenza in presenza di entrambi gli antigeni *target*. La mesotelina è un TAA espresso da molti tumori maligni ed i CAR specifici per questo antigene sono stati studiati in trial clinici per trattare pazienti con cancro del pancreas e mesotelioma pleurico. In termini di persistenza, i pazienti con tumore del pancreas sono stati trattati con cellule T che contemporaneamente esprimevano due CAR contro la mesotelina ed il CD19 in trial clinici^{18,21}. Un altro target analizzato è la proteina di membrana cellulare mucin-1 (MUC1), una grande proteina che trasporta O-glicano sovra espressa nella maggior parte degli adenocarcinomi. I CAR diretti contro il glicopeptide MUC-1 sono stati progettati sulla base dell'anticorpo monoclonale (5E5) e queste cellule CAR-T hanno dimostrato efficacia nell'eliminare le cellule tumorali pancreatiche²²⁻²⁴. Considerato che l'interleuchina-4 (IL-4) ha numerosi link fisiopatologici e terapeutici con i tumori e può promuovere la funzione delle cellule CAR-T, sono state progettate cellule CAR-T specifiche per MUC-1 con il recettore dell'IL-4 le quali hanno dimostrato un incremento della resistenza alle citochine immunosoppressive ed hanno incrementato l'efficacia antitumorale^{23,25}. HER-2 è un membro della famiglia dei recettori tirosin-chinasici ed è sovra-espresso in molte cellule tumorali così come in alcune cellule

epiteliali. In trial clinici ancora in corso, i pazienti con tumori che esprimono HER2 sono stati trattati con CAR specifici contro HER-2 di seconda generazione (CD28/CD3z)²⁰. Numerosi gruppi di ricerca stanno tentando di progettare due CAR in una singola cellula T capace di riconoscere specificatamente le cellule tumorali; sono state infatti progettate specifiche CAR HER-2 e MUC-1 con CD3z e molecole co-stimolatorie dentro una singola cellula T che può eliminare la cellula tumorale in modo efficiente e compensare le varianti *escape* dell'antigene tumorale quando si controllano le cellule bersaglio che co-esprimono MUC-1 e HER-2.^{20,26}

MICROAMBIENTE TUMORALE

Le cellule T devono essere in grado di dirigersi verso i siti tumorali per esercitare le loro funzioni in vivo e per fare ciò, nei tumori solidi, devono superare la matrice extracellulare (ECM) formata principalmente da proteoglicani di eparan solfato (HSPG). Le CAR-T devono superare l'ostacolo dato dall'HSPG in tumori con una forte componente stromale ma queste cellule non hanno la capacità di esprimere l'enzima eparanasi (HPSE), enzima necessario per degradare i proteoglicani di eparan solfato²⁷. Per risolvere questo problema sono state progettate cellule CAR-T che possono secernere HPSE per favorire l'infiltrazione e la conseguente attività antitumorale²⁸. Anche i recettori delle chemochine possono essere utilizzati per aumentare il traffico cellulare; ad esempio, le cellule CAR-T dirette contro il CD30 progettate con il recettore per le chemochine CC4 (CCR4) hanno aumentato la capacità migratoria di queste cellule in modelli murini di linfoma di Hodgkin²⁹. Le cellule CAR-T che esprimono il recettore delle chemochine CC2b (CCR2b) hanno anche migliorato la migrazione nel mesotelioma e nel neuroblastoma che secreta naturalmente grandi quantità di ligando delle chemochine CC2 (CCL2)³⁰. Oltre alle chemochine, nei tessuti tumorali gli abbondanti vasi sanguigni possono esprimere molecole immunosoppressive e promuovere la crescita dei tumori stessi. Quindi, mirare alla vascolarizzazione del tumore è una strategia per migliorare l'immunoterapia cellulare e studi hanno confermato come la scarsa prognosi e le metastasi siano dovute anche alla sovra-espressione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) ed il recettore (VEGF-R) nel microambiente tumorale. Per questi motivi il recettore del VEGF-2 (VEGFR2) è in studio come target delle cellule CAR-T in pazienti con tumori metastatici^{31,32}. Ad oggi, non ci sono metodi per superare l'effetto inibitorio del microambiente tumorale e pertanto, è necessario sviluppare nuove CAR per diminuire l'inibizione del microambiente tumorale sulle CAR-T stesse e migliorarne di conseguenza, le capacità anti-tumorali. È stato evidenziato come PD1 o CTLA4 possano inibire la funzione delle cellule T nel microambiente tumorale e vari farmaci inibitori dei checkpoint, che bloccano il segnale inibitorio delle cellule T, abbiano avuto risultati positivi nel trattamento di diversi tipi di tumore³³. CAR-T capaci di secernere anticorpi PD1 e/o CTLA4 sono state progettate per migliorare l'immunosoppressione e l'effetto anti-tumorale conseguente negli studi clinici; è stato dimostrato che il volume del tumore può essere ridotto da CAR-PD1 specifiche^{34,35}. Anche l'adenosina,

un potente fattore immunosoppressivo, è considerato un potenziale target per i CAR; è stato dimostrato che i recettori A2A di adenosina (A2AR) possono essere up-regolati dalle cellule CAR-T per ridurre la reazione immunitaria. Il blocco di A2AR ha ottenuto grandi risposte antitumorali nei trial clinici ed in particolare con l'aiuto del contemporaneo blocco di PD-1³⁶. Oltre all'importanza ed alla specificità dei target tumorali e del microambiente (ECM, vasi e cellule immunitarie), alcuni studi hanno evidenziato come la distanza tra domini di riconoscimento dell'antigene e gli obiettivi specifici possa influenzare la funzione dei CAR³⁷.

SICUREZZA

Nonostante un profilo rischio/beneficio favorevole, le cellule CAR-T hanno anche la capacità di causare eventi avversi (ADR) attesi ed inattesi tra cui: sindrome da rilascio di citochine, tossicità neurologica, riconoscimento di target non tumorali ed anafilassi. Le tossicità teoriche tra cui l'espansione clonale secondaria all'oncogenesi inserzionale e la malattia *graft vs host* non sono state ancora clinicamente evidenti. Perciò, a causa delle restrizioni di gravi tossicità correlate al trattamento, è difficile applicare l'attuale terapia CAR-T. L'utilizzo di recettori chimerici bi-specifici e strategie CAR-T duali possono aiutare a ridurre il rischio di sviluppo di ADR oltre, come detto, ad aumentarne la specificità³⁸. Ad esempio, CAR multi-catena basate sullo *scaffold* dei recettori FcεRI hanno dimostrato un profilo migliore di sicurezza. Lo *scaffold* del recettore FcεRI ha tre diverse catene polipeptidiche (α , β e γ) e queste catene polipeptidiche sono sostituite da un dominio di riconoscimento dell'antigene, una molecola co-stimolante e CD3z. In queste cellule CAR-T, tra il sito di legame l'antigene ed il dominio cerniera, sono incorporati i domini FKBP e/o FRB che hanno un'alta affinità per la rapamicina; aggiungendo la rapamicina o analoghi della rapamicina, è stata dimostrata una maggiore sicurezza di queste cellule CAR-T³⁹. È ovviamente altamente desiderabile progettare CAR universali che abbiano la capacità di riconoscere più TAA che minimizzino il rischio di tossicità correlate al trattamento. Uno studio recente ha riportato una nuova e strategica CAR che può estendere la specificità ed il potenziale di sicurezza delle cellule CAR-T utilizzando un sistema di biotina-avidina e questa strategia terapeutica si è dimostrata valida in topi con glioma EGFRvIII positivo⁴⁰.

Lo sviluppo della tecnologia *gene-editing* ha anche contribuito a migliorare la sicurezza. L'attività delle cellule CAR-T può essere interrotta attivando il gene della caspasi-9 (iCasp9) che può indurre l'apoptosi delle cellule stesse per superare gli ADR. Un altro gene che può indurre l'eliminazione di queste cellule è l'EGFR troncato, in questo caso l'attività delle cellule CAR-T può essere rapidamente eliminata con la somministrazione di cetuximab, che lega l'EGFR troncato, per prevenire eventi di tossicità grave⁴¹. Tuttavia, queste strategie geniche possono portare ad una riduzione dell'efficacia eliminando indiscriminatamente le cellule ed inoltre, il *gene-editing* è anche capace di produrre cellule CAR-T che hanno la capacità di scongiurare la malattia graft

vs host (*GvHD*) indotta da cellule allogeniche CAR-T attraverso l'eliminazione dell'espressione del recettore delle cellule T endogene (TCR) e migliorarne quindi la sicurezza⁴².

CONCLUSIONI

Negli ultimi anni, l'immunoterapia delle cellule CAR-T ha raggiunto risultati altamente efficaci nel trattamento di patologie onco-ematologiche ed ha ottenuto molti progressi sugli antigeni target e l'applicazione combinata di cellule immunitarie e piccole molecole sintetiche. Nonostante i progressi significativi, alcune importanti sfide non sono ancora state risolte nel trattare i tumori solidi soprattutto in termini di specificità, persistenza, sicurezza e microambiente immunosoppressivo. Rimangono barriere significative nell'applicazione clinica più ampia delle CAR-T ma numerosi studi sono in corso e ci si aspetta in futuro un più ampio utilizzo di cellule CAR-T più specifiche e sicure⁴³.

PUNTI CHIAVE:

- *La terapia CAR-T è un tipo di trattamento in cui i linfociti T del paziente vengono modificati in laboratorio con l'aggiunta di un gene che esprime uno specifico recettore.*
- *L'immunoterapia con i CAR-T si è sviluppata rapidamente ed è considerata promettente.*
- *Nonostante un profilo rischio/beneficio favorevole, le cellule CAR-T hanno anche la capacità di causare eventi avversi (ADR) attesi ed inattesi.*
- *Rimangono barriere significative nell'applicazione clinica più ampia delle CAR-T ma numerosi studi sono in corso e ci si aspetta in futuro un più ampio utilizzo di cellule CAR-T più specifiche e sicure.*

BIBLIOGRAFIA

1. Cheadle, E. J. et al. Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy. *Methods Mol. Biol.* 907, 645–66 (2012).
2. First two CAR-T cell medicines recommended for approval in the European Union | European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/news/first-two-car-t-cell-medicines-recommended-approval-european-union>. (Accessed: 6th December 2018)
3. Sadelain, M., Brentjens, R. & Rivière, I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov.* 3, 388–98 (2013).
4. Jackson, H. J., Rafiq, S. & Brentjens, R. J. Driving CAR T-cells forward. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 13, 370–83 (2016).
5. Yong, C. S. M. et al. CAR T-cell therapy of solid tumors. *Immunol. Cell Biol.* 95, 356–363 (2017).
6. Ma, J. S. Y. et al. Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E450-8 (2016).
7. Jackson, H. J., Rafiq, S. & Brentjens, R. J. Driving CAR T-cells forward. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 13, 370–383 (2016).
8. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2017. *CA. Cancer J. Clin.* 67, 7–30 (2017).
9. Cheadle, E. J. et al. CAR T cells: driving the road from the laboratory to the clinic. *Immunol. Rev.* 257, 91–106 (2014).
10. Srivastava, S. & Riddell, S. R. Engineering CAR-T cells: Design concepts. *Trends Immunol.* 36, 494–502 (2015).
11. Kochenderfer, J. N. & Rosenberg, S. A. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 10, 267–276 (2013).
12. Kalos, M. Tumor antigen-specific T cells and cancer immunotherapy: current issues and future prospects. *Vaccine* 21, 781–6 (2003).
13. Priceman, S. J., Forman, S. J. & Brown, C. E. Smart CARs engineered for cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Oncol.* 27, 466–74 (2015).
14. Kochenderfer, J. N. et al. Donor-derived CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 122, 4129–39 (2013).
15. Morgan, R. A. et al. Recognition of glioma stem cells by genetically modified T cells targeting EGFRvIII and development of adoptive cell therapy for glioma. *Hum. Gene Ther.* 23, 1043–53 (2012).
16. Morgan, R. A. et al. Recognition of Glioma Stem Cells by Genetically Modified T Cells Targeting EGFRvIII and Development of Adoptive Cell Therapy for Glioma. *Hum. Gene Ther.* 23, 1043–1053 (2012).
17. Pegram, H. J. et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood* 119, 4133–4141 (2012).
18. Wang, X. et al. A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood* 118, 1255–63 (2011).
19. Grupp, S. A. et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 368, 1509–1518 (2013).
20. Ahmed, N. et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) -Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *J. Clin. Oncol.* 33, 1688–96 (2015).
21. Hassan, R. & Ho, M. Mesothelin targeted cancer immunotherapy. *Eur. J. Cancer* 44, 46–53 (2008).
22. Wilkie, S. et al. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J. Clin. Immunol.* 32, 1059–70 (2012).

23. Finn, O. J. et al. Importance of MUC1 and spontaneous mouse tumor models for understanding the immunobiology of human adenocarcinomas. *Immunol. Res.* 50, 261–268 (2011).
24. Tarp, M. A. & Clausen, H. Mucin-type O-glycosylation and its potential use in drug and vaccine development. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 546–63 (2008).
25. Jackson, H. J., Rafiq, S. & Brentjens, R. J. Driving CAR T-cells forward. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 13, 370–383 (2016).
26. Cheadle, E. J. et al. CAR T cells: driving the road from the laboratory to the clinic. *Immunol. Rev.* 257, 91–106 (2014).
27. Bernfield, M. et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 729–77 (1999).
28. Caruana, I. et al. Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirected T lymphocytes. *Nat. Med.* 21, 524–9 (2015).
29. Di Stasi, A. et al. T lymphocytes coexpressing CCR4 and a chimeric antigen receptor targeting CD30 have improved homing and antitumor activity in a Hodgkin tumor model. *Blood* 113, 6392–402 (2009).
30. Craddock, J. A. et al. Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b. *J. Immunother.* 33, 780–8 (2010).
31. Chen, J.-C., Chang, Y.-W., Hong, C.-C., Yu, Y.-H. & Su, J.-L. The role of the VEGF-C/VEGFRs axis in tumor progression and therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 88–107 (2012).
32. Huang, H. et al. VEGF suppresses T-lymphocyte infiltration in the tumor microenvironment through inhibition of NF- κ B-induced endothelial activation. *FASEB J.* 29, 227–38 (2015).
33. Tanvetyanon, T., Gray, J. E. & Antonia, S. J. PD-1 checkpoint blockade alone or combined PD-1 and CTLA-4 blockade as immunotherapy for lung cancer? *Expert Opin. Biol. Ther.* 17, 305–312 (2017).
34. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 12, 252–264 (2012).
35. Topalian, S. L., Drake, C. G. & Pardoll, D. M. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 27, 450–61 (2015).
36. Beavis, P. A. et al. Targeting the adenosine 2A receptor enhances chimeric antigen receptor T cell efficacy. *J. Clin. Invest.* 127, 929–941 (2017).
37. Qin, L. et al. Incorporation of a hinge domain improves the expansion of chimeric antigen receptor T cells. *J. Hematol. Oncol.* 10, 68 (2017).
38. Bole-Richard, E., Deschamps, M., Ferrand, C. & Robinet, E. Editorial: Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer. *Front. Pharmacol.* 6, 1–8 (2015).
39. Xu, D. et al. The development of CAR design for tumor CAR-T cell therapy. *Oncotarget* 9, 13991–14004 (2018).
40. Urbanska, K. et al. A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. *Cancer Res.* 72, 1844–52 (2012).
41. Jaspers, J. E. & Brentjens, R. J. Development of CAR T cells designed to improve antitumor efficacy and safety. *Pharmacol. Ther.* 178, 83–91 (2017).
42. Poirot, L. et al. Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for “Off-the-Shelf” Adoptive T-cell Immunotherapies. *Cancer Res.* 75, 3853–3864 (2015).
43. Lipowska-Bhalla, G., Gilham, D. E., Hawkins, R. E. & Rothwell, D. G. Targeted immunotherapy of cancer with CAR T cells: achievements and challenges. *Cancer Immunol. Immunother.* 61, 953–62 (2012).