

# Cellules T à récepteur antigénique chimérique : limites actuelles et développements à venir

**Marion Alcantara**, Institut Curie, université Paris Sciences et Lettres, Inserm U932, Paris France

**Roch Houot**, Service d'hématologie clinique, CHU de Rennes, université de Rennes, Inserm U1236, EFS, Rennes France

Tirés à part : M. Alcantara  
marion.alcantara76@gmail.com

Liens d'intérêt : Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article.

## *CAR T-cells: current limitations and future developments*

Cellules T à récepteur antigénique chimérique (CAR-T), CD19, thérapie cellulaire, résistance, toxicité  
*CAR T-cells, CD19, cell therapy, resistance, toxicity*

### Résumé

Les cellules T à récepteur antigénique chimérique (CAR-T) représentent une avancée thérapeutique majeure en oncologie. À ce jour, deux CAR-T anti-CD19 ont été agréées pour le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques B et des lymphomes diffus à grandes cellules B en rechute/réfractaires. Même si ces traitements ont montré une efficacité remarquable chez ces patients en échec des traitements habituels, leur utilisation est limitée par la survenue de résistances et/ou de toxicités sévères. Une meilleure compréhension de ces phénomènes et l'amélioration des outils de biologie moléculaire permettent d'envisager le développement de nouvelles générations de CAR-T, plus efficaces et/ou moins toxiques. Dans cette revue, nous faisons le point sur les mécanismes à l'origine des résistances et des toxicités, et sur les voies d'optimisation qui sont envisagées.

### Abstract

Chimeric antigen receptor (CAR) T-cells represent a great breakthrough in the treatment of hematologic malignancies. To date, two different CAR T-cells have been approved for the treatment of relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia and diffuse large B-cell lymphoma. Despite a remarkable efficacy, their use is limited by the occurrence of resistances and/or severe toxicities. A better understanding of these mechanisms and the progress in molecular intervention are paving the way for the development of new generations of CAR T-cells, with enhanced efficacy and/or reduced toxicity. Here, we review the mechanisms of resistance and toxicity, and the strategies which are envisioned to optimize CAR T-cell therapy.

Les cellules T à récepteur antigénique chimérique (CAR-T) sont des lymphocytes T génétiquement modifiés pour exprimer un récepteur de surface capable de rediriger leur spécificité contre les cellules tumorales. Le récepteur est dit chimérique car il est composé d'une partie extracellulaire qui se lie à l'antigène tumoral à la manière d'un anticorps, donc de façon indépendante du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), et d'une partie intracellulaire qui mime les signaux d'activation du *T-cell receptor* (TCR) [1, 2]. La transduction de ce récepteur se fait généralement par l'intermédiaire d'un vecteur rétro- ou lentiviral.

Deux CAR-T anti-CD19, axicabtagène ciloleucel (axi-cel) et tisagenlecleucel (tisa-cel), ont été approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) et l'Agence européenne des médicaments (EMA) pour le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL-B) et des lymphomes diffus à grandes cellules B (LDGCB) en rechute/réfractaires. Ces CAR-T

Pour citer cet article : Alcantara M, Houot R. Cellules T à récepteur antigénique chimérique : limites actuelles et développements à venir. *Hématologie* 2020 ; 26(supplément 5) : 38-45. doi : 10.1684/hma.2020.1583

ont montré une efficacité remarquable chez des patients en échec des traitements habituels. L'étude ZUMA-1 présente la plus grande cohorte publiée de patients traités par axi-cel pour un LDGCB réfractaire (N = 101). Dans cette étude, le taux de réponse globale était de 83 %, dont 58 % de réponses complètes, et la survie globale médiane n'était pas atteinte après un suivi médian de 27 mois [3]. L'efficacité du tisa-cel a été évaluée dans l'étude JULIET chez 93 patients présentant un LDGCB en rechute/réfractaire : le taux de réponse globale était de 52 %, dont 40 % de réponses complètes, et la survie globale médiane de 12 mois [4]. Enfin l'essai ELIANA a étudié l'efficacité du tisa-cel chez 75 enfants et jeunes adultes présentant une LAL-B en rechute/réfractaire [5]. Le taux de réponse complète était de 81 %, dont 95 % de maladie résiduelle indétectable à un mois, et la survie globale à un an était de 76 %. Malgré ces résultats encourageants, un certain nombre de patients vont présenter une résistance au traitement par CAR-T. Cette résistance peut être soit primaire (absence de réponse) soit secondaire (réponse puis rechute). Par ailleurs, les traitements par CAR-T s'accompagnent fréquemment de toxicités aiguës dont les plus fréquentes sont le syndrome de relargage de cytokines (CRS) et la toxicité neurologique (ICANS, pour *immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome*). Ces toxicités peuvent menacer le pronostic vital et nécessiter une prise en charge en réanimation. Dans cette revue, nous faisons le point sur les mécanismes à l'origine des résistances et des toxicités, et sur les voies d'optimisation qui sont envisagées.

## Mécanismes de résistance

Les premières études montrent que 40 à 70 % des patients ne vont jamais répondre aux traitements par CAR-T (résistance primaire) ou vont rechuter après une réponse initiale (résistance secondaire). Ces rechutes sont principalement observées durant la première année qui suit l'injection des CAR-T. Les rechutes CD19+ (sans perte de la cible) sont classiquement plus précoces que les rechutes CD19- qui sont souvent plus tardives [6].

Les mécanismes de résistance aux CAR-T peuvent être liés :

- aux caractéristiques intrinsèques des CAR-T,
- ou aux caractéristiques de la tumeur (*tableau 1*).

### Résistance liée à la tumeur

L'un des mécanismes d'échappement aux CAR-T le mieux décrit est celui de la perte de la cible. Ainsi Neelapu *et al.* ont récemment présenté l'analyse de 16 biopsies pré- et post-traitement par axi-cel chez des patients atteints de lymphome : la perte d'expression du CD19 en immunohistochimie était identifiée chez 25 % des patients au moment de la rechute alors que les autres marqueurs B (CD20, CD22, CD79a et PAX5) étaient toujours présents [7]. Plusieurs mécanismes ont été rapportés comme pouvant conduire à la perte du CD19. Certaines mutations du

Tableau 1

| Synthèse des principaux mécanismes de résistance aux CAR-T. |   |
|---|---|
| Résistance liée aux CAR-T                                   | Résistance liée à la tumeur   |
| Expansion insuffisante                                      | Perte de la cible (mutations, épissage alternatif, <i>lineage switch</i> , masquage de l'épitope par transduction accidentelle de cellules tumorales) |
| Défaut de persistance                                       | Résistance à la mort induite par les CAR-T (défaut d'apoptose)  |
| Exhaustion  | Microenvironnement tumoral (immunosuppression, <i>trafficking</i> , etc.)   |



gène *CD19* ou son épissage alternatif peuvent conduire à la perte de l'épitope [7, 8]. La perte du CD19 a également été observée chez des patients recevant des CAR-T anti-CD19 pour une LAL-B avec réarrangement de *MLL* (pour *mixed-lineage leukemia*) qui ont présenté une rechute sous forme de leucémie aiguë myéloïde (*lineage switch*) (9). La perte de l'antigène (ou une diminution de sa densité) peut ainsi entraîner une rechute alors même que les CAR-T sont toujours présents [10]. L'émergence de ces résistances est souvent le fruit d'une sélection clonale. En effet, l'existence de sous-clones CD19 négatifs a été décrite au diagnostic de LAL-B [11]. De façon exceptionnelle, le CD19 peut également être masqué par le récepteur chimérique si celui-ci est exprimé par les cellules tumorales. Ainsi Ruella *et al.* ont publié le cas d'une transduction accidentelle du CAR anti-CD19 dans un blaste de LAL-B [12]. Les récepteurs chimériques anti-CD19 exprimés par les blastes se liraient aux molécules CD19 de surface masquant ainsi l'épitope et empêchant leur reconnaissance par les CAR-T.

Dans certains cas, les cellules tumorales, bien que reconnues par les CAR-T, ne peuvent pas être tuées par ces derniers. En effet, deux équipes différentes ont récemment montré que certaines cellules tumorales de LAL et de lymphome présentaient des altérations des gènes des voies d'apoptose les rendant résistantes à la mort induite par les CAR-T [13, 14].

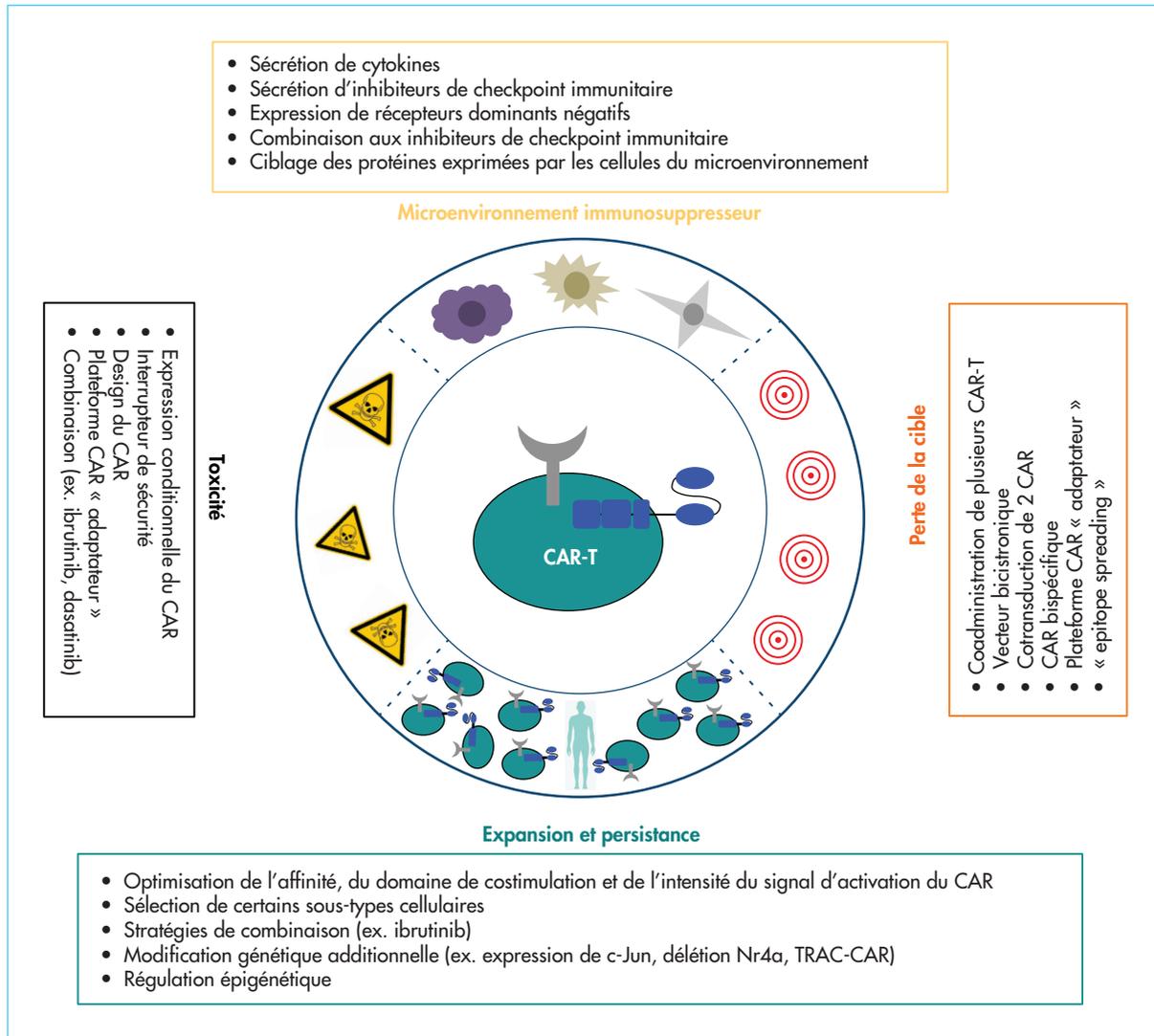
Enfin, un certain nombre de tumeurs, essentiellement solides, se développent au sein d'un microenvironnement immunosuppresseur susceptible d'empêcher les CAR-T d'atteindre la tumeur ou d'exercer leur action cytotoxique [15]. Ainsi les tumeurs peuvent être qualifiées de « chaudes » ou « froides » [16], selon leur infiltrat immunitaire. Celui-ci varie sur un plan quantitatif et qualitatif selon le degré d'infiltration par des lymphocytes T (TIL) cytotoxiques, l'expression de check-point immunitaire (PD-1 [pour *programmed cell death 1*], PD-L1 [pour *PD-1 ligand*], CTLA4 [pour *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*], LAG3 [pour *lymphocyte-activation gene 3*] et TIM3 [pour *T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3*]) par les cellules tumorales ou celles de leur environnement, la présence de cellules immunosuppressives (lymphocytes T régulateurs, cellules suppressives dérivées des myéloïdes), ou encore la sécrétion de facteurs solubles inhibiteurs (facteur de croissance transformant  $\beta$  [TGF $\beta$ ], interleukine [IL]-10). La composition du microenvironnement régule également la circulation (*trafficking*) des lymphocytes T qui se retrouvent parfois « bloqués » en périphérie et dans l'incapacité d'atteindre les cellules tumorales [16]. Des données préliminaires suggèrent que la composition du microenvironnement des LDGCB pourrait impacter la réponse aux CAR-T [17].

### Résistance liée aux cellules T à récepteur antigénique chimérique

Plusieurs mécanismes de résistance ou d'échec liés aux caractéristiques intrinsèques des CAR-T ont été décrits.

L'absence de réponse durable aux CAR-T peut être liée à une expansion ou à une persistance insuffisante de ces derniers. Plusieurs études ont en effet montré que l'expansion initiale est associée à la qualité de la réponse et qu'un défaut de persistance, notamment dans les LAL-B, est associé à un risque de rechute [3, 5, 18-20]. Cette cinétique cellulaire est conditionnée par les signaux de costimulation se trouvant en aval du CAR. Les CAR-T actuellement commercialisés sont dits de deuxième génération car ils comportent deux signaux d'activation : le CD3 $\zeta$  et une molécule de costimulation, CD28 pour axi-cel ou 4-1BB (CD137) pour tisa-cel. La structure du CAR a un impact sur le phénotype, le métabolisme, la fonction et la persistance. Les CAR-T avec une costimulation CD28 sont généralement associés à une prolifération plus intense et à un phénotype « effecteur mémoire », alors que les CAR avec une costimulation 4-1BB s'accompagnent d'une réponse plus progressive, d'une persistance prolongée et d'une différenciation de type « centrale mémoire » [21].

FIGURE 1



Représentation schématique des enjeux et des stratégies pour l'optimisation des traitements par CAR-T.

Les CAR-T peuvent également présenter un défaut de persistance non pas quantitative mais fonctionnelle, secondaire à leur exhaustion. En d'autres termes, les CAR-T sont toujours présents mais ils ont perdu leur activité cytotoxique. Le défaut de persistance (quantitative ou fonctionnelle) des CAR-T peut facilement être mis en évidence par la réapparition de lymphocytes B circulants.

De nombreux paramètres (qualité du produit d'aphérèse, protocole utilisé pour l'ingénierie cellulaire, design du CAR, phénotype des CAR-T) sont susceptibles d'impacter l'efficacité des CAR-T mais il n'existe pas, à ce jour, de données cliniques très claires faisant préférer l'un ou l'autre de ces paramètres [6].

### Mécanismes de toxicité

Le CRS et l'ICANS sont des effets secondaires fréquents des CAR-T et un consensus a récemment été obtenu pour quantifier leur sévérité [22].



Le CRS survient lorsque les CAR-T s'activent et prolifèrent après reconnaissance de leur cible. Cette activation est associée à la libération par le lymphocyte T modifié de différentes cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (interféron  $\gamma$  [IFN $\gamma$ ], IL-6, etc.) qui stimulent les cellules de l'immunité innée comme les macrophages qui, en retour, vont également sécréter des médiateurs solubles qui entretiennent le CRS [23]. Cliniquement, le CRS se manifeste le plus souvent par de la fièvre, une hypotension, et/ou une hypoxie mais il peut toucher tous les organes et mettre rapidement en jeu le pronostic vital.

La physiopathologie de l'ICANS est moins bien connue. Elle pourrait être liée aux CAR-T qui peuvent être identifiés dans le liquide céphalo-rachidien, à la libération des cytokines pro-inflammatoires qui contribuent notamment à l'activation endothéliale, à l'augmentation de la perméabilité vasculaire et à l'altération de la barrière hémato-encéphalique [24]. Les symptômes décrits sont très variés, pouvant aller d'une simple confusion au coma.

## Futur des cellules T à récepteur antigénique chimérique (figure 1)

### Améliorer la cinétique cellulaire (expansion et persistance)

Certaines données précliniques suggèrent que la composition cellulaire du produit injecté, notamment le ratio CD4/CD8 [25] et le phénotype (naïf, central mémoire, effecteur mémoire, effecteur) des CAR-T pourraient avoir un impact sur leur prolifération et leur persistance, même si ceci reste à démontrer en clinique [26]. L'importance de la régulation épigénétique des CAR-T a été soulignée par un cas de mutagenèse insertionnelle ayant conduit à la perte de fonction du gène *TET2* dans une cellule transduite anti-CD19 chez un patient de 78 ans présentant une leucémie lymphoïde chronique réfractaire [27]. Cette perte fonctionnelle de *TET2* s'est traduite par une meilleure capacité de prolifération, un phénotype central mémoire des CAR-T, et une efficacité clinique inattendue avec une maladie résiduelle toujours indétectable plus de quatre ans après l'injection des CAR-T. Concernant le gène chimérique transduit, d'autres approches visent à diminuer son affinité pour l'antigène [28] afin d'augmenter la prolifération et la persistance des CAR-T, ou encore à réduire l'intensité du signal d'activation [29] pour améliorer la persistance.

Enfin, nous avons cité plus haut l'impact du domaine de costimulation sur l'expansion et la persistance. Une troisième génération de CAR-T est en cours de développement qui comporte un domaine de costimulation additionnel (CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, CD27 ou NKG2D) mais leur supériorité clinique reste à démontrer.

### Diminuer l'exhaustion

Les technologies dédiées à l'édition du génome (notamment CRISPR/Cas9 [pour *clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein 9*]) permettent désormais de réaliser une insertion dirigée du gène chimérique. Ainsi, il a été montré que si celui-ci est inséré en lieu et place du locus du TCR (chaîne  $\alpha$ ) (TRAC-CAR), ceci diminuait l'exhaustion des CAR-T et augmentait leur efficacité [30]. D'autres données précliniques montrent que la délétion des facteurs de transcription Nr4a [31], ou encore la surexpression du facteur de transcription c-Jun [32] pourraient augmenter la persistance fonctionnelle des CAR-T.

Parallèlement aux stratégies visant à modifier les CAR-T eux-mêmes, un certain nombre d'études tentent de les combiner avec d'autres traitements. Des thérapies ciblées sont susceptibles de prévenir l'exhaustion des CAR-T. À titre d'exemple, l'équipe de Ruella a rapporté que l'adjonction d'ibrutinib améliorait l'efficacité de CAR-T anti-CD19 dans un modèle murin de xénogreffe d'une lignée de lymphome à cellules du manteau sensible à l'ibrutinib [33]. De façon intéressante, l'ibrutinib est

associé à une réduction de l'expression des marqueurs d'exhaustion (PD-1, TIM-3, LAG-3) par les CAR-T lorsque ceux-ci sont mis en culture avec la lignée cellulaire. Des résultats cliniques préliminaires suggèrent que l'adjonction d'ibrutinib pourrait augmenter l'efficacité des CAR-T chez les patients [34].

### Prévenir les résistances/échappements par perte de la cible

Pour prévenir les résistances liées à la perte de la cible par les cellules tumorales, des CAR-T « multispécifiques » (CD19/CD22 ou CD19/CD20 par exemple) ont été développés et sont en cours d'évaluation clinique [35]. Différentes approches [35] permettent de cibler deux antigènes, telle que la coadministration de deux CAR-T ciblant chacun un antigène différent, l'utilisation d'un vecteur bicistronique qui conduit à l'expression de deux CAR distincts sur la même cellule, la cotransduction de deux vecteurs codant chacun pour un CAR ou encore l'expression d'un CAR bispécifique (aussi appelé CAR tandem).

Une autre stratégie, appelée CAR « adaptateur » est en cours de développement, essentiellement dans les tumeurs solides, pour cibler plus de deux antigènes [26]. Son principe consiste à utiliser des CAR-T dont le scFv ne reconnaît pas un antigène de tumeur mais se lie à un ou plusieurs « adaptateurs » solubles spécifiques d'un antigène tumoral. L'enjeu majeur de ce type d'approche est de bien maîtriser les propriétés pharmacologiques (demi-vie, stabilité, etc.) de l'adaptateur soluble, en plus des caractéristiques intrinsèques aux CAR-T.

D'autres approches consistent à générer/amplifier une réponse immunitaire antitumorale naturelle contre différents antigènes (*epitope spreading*) afin de prévenir les échappements par perte de la cible. Ainsi, des CAR-T expriment de façon constitutive des molécules telles que CD40L [36, 37], Flt3L [38] ou 4-1BBL [39] dans le but de stimuler la réponse immunitaire endogène en fournissant un signal de stimulation aux cellules présentatrices d'antigènes ou aux lymphocytes T adjacents infiltrant la tumeur.

### Moduler le microenvironnement

Les CAR-T peuvent être « équipés » de gènes visant à modifier le microenvironnement tumoral ou à les rendre résistants à l'immunosuppression induite par la tumeur. Certains CARs, appelés TRUCK (pour *T cells redirected for universal cytokine killing*), sont conçus pour sécréter des cytokines immunostimulantes telle que l'IL-12 ou l'IL-18.[1]

La combinaison des CAR-T avec des inhibiteurs de checkpoint immunitaire (anti-PD-1 ou anti-PD-L1) est une autre stratégie en cours d'exploration pour bloquer l'immunosuppression tumorale liée à PD-L1. Les premiers résultats de l'étude ZUMA-6 testant l'association d'axi-cel et d'atézolizumab (anti-PD-L1) ont été récemment présentés au congrès virtuel de l'American Association for Cancer Research (AACR) de 2020 [40] chez 34 patients. Cette combinaison présente un profil de tolérance et d'efficacité similaire à axi-cel seul dans les LDGCB en rechute ou réfractaires. Des analyses biologiques ancillaires sont nécessaires pour évaluer le bénéfice éventuel de cette association dans certains sous-groupes de patients. Une approche similaire consiste à modifier génétiquement les CAR-T pour leur faire sécréter un anticorps anti-PD-1 au site tumoral, ce qui augmenterait la concentration de l'anti-PD-1 à la tumeur et limiterait la toxicité systémique. Il est intéressant de noter que, dans un modèle de xéno greffe de tumeur ovarienne métastatique, les souris traitées avec cette approche innovante ont une survie supérieure à celle des souris qui reçoivent les CAR-T anti-MUC16<sup>ecto</sup> en association à un anticorps anti-PD-1 [42].

D'autres CAR-T coexpriment des récepteurs dominants négatifs (induisant donc une perte de fonction) de certains checkpoints (PD-1 ou TGFβ notamment) qui les rendent résistants à ces signaux inhibiteurs [42].



Enfin, les CAR-T peuvent être dirigés contre un antigène exprimé par les cellules du microenvironnement tumoral. À titre d'exemple, Sakemura et al. ont présenté lors du congrès de l'American Society of Hematology (ASH) de 2019 la supériorité de CAR-T ciblant à la fois BCMA et une protéine exprimée par les fibroblastes associés au cancer par rapport aux CAR-T anti-BCMA, dans un modèle préclinique de myélome multiple [43].

### Réduire la toxicité

Pour limiter ou contrôler la toxicité des CAR-T, certaines constructions incluent une expression conditionnelle du récepteur chimérique (récepteurs synNotch) ou encore un interrupteur de sécurité (*safety switch*) grâce à un gène suicide ou à une molécule permettant d'éliminer les CAR-T [26]. Certains CAR-T sont, par exemple, modifiés génétiquement pour exprimer un mimotope du CD20 ou du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR), ce qui permet leur élimination par le rituximab ou le cétuximab, si nécessaire.

La construction du gène chimérique joue également un rôle dans la toxicité des cellules. La sécrétion de cytokines par les CAR-T dépend de la charnière et de la région transmembranaire [44]. De façon intéressante, l'utilisation d'un scFv entièrement humain pourrait être associée à une réduction de la toxicité neurologique chez des patients présentant un lymphome B [45].

Les approches de type CAR « adaptateur » pourraient également faciliter le contrôle des effets indésirables puisque les CAR-T ne s'activent qu'en présence de l'adaptateur soluble [26].

Pour finir, certaines stratégies de combinaison sont proposées pour réduire la toxicité. Ainsi, une analyse chez des patients présentant une leucémie lymphoïde chronique suggère que l'association d'ibrutinib aux CAR-T anti-CD19 diminuerait les syndromes de relargage de cytokines sévères [34]. Des études complémentaires sont toutefois nécessaires pour confirmer ces résultats. Enfin, le dasatinib bloque l'activité des CAR-T sans altérer leur viabilité dans des modèles précliniques *in vitro* et *in vivo* [46].

## Conclusion

Les CAR-T ont ouvert un champ thérapeutique nouveau en oncohématologie, dont les possibilités sont aussi vastes que complexes. Ces thérapies cellulaires ciblées font désormais partie de l'arsenal thérapeutique des LDGCB et des LAL-B. De nombreux travaux sont en cours pour améliorer leur efficacité et leur tolérance. Ceux-ci sont rendus possibles grâce aux progrès des connaissances concernant les mécanismes de résistance et de toxicité, et par l'essor des technologies d'ingénierie moléculaire qui permettent de « reprogrammer » finement les lymphocytes T pour leur permettre d'accomplir leur mission.

### Références

- [1] Sadelain M, Rivière I, Riddell S. Therapeutic T-cell engineering. *Nature* 2017 ; 545 (7655) : 423-31.
- [2] June CH, Sadelain M. Chimeric antigen receptor therapy. *N Engl J Med* 2018 ; 379 (1) : 64-73.
- [3] Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, et al. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multi-centre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol* 2019 ; 20 (1) : 31-42.
- [4] Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2019 ; 380 (1) : 45-56.
- [5] Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2018 ; 378 (5) : 439-48.
- [6] Shah NN, Fry TJ. Mechanisms of resistance to CAR T-cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2019 ; 16 (6) : 372-85.
- [7] Neelapu SS, Rossi JM, Jacobson CA, et al. CD19-Loss with preservation of other B-cell lineage features in patients with large B-cell lymphoma who relapsed post axi-cel. *Blood* 2019 ; 134 (Suppl\_1) : 203-1203.
- [8] Sotillo E, Barrett DM, Black KL, et al. Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CAR T-19 immunotherapy. *Cancer Discov* 2015 ; 5 (12) : 1282-95.
- [9] Gardner R, Wu D, Cherian S, et al. Acquisition of a CD19-negative myeloid



phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR T-cell therapy. *Blood* 2016 ; 127 (20) : 2406-10.

- [10] Hamieh M, Dobrin A, Cabriolu A, et al. CAR T-cell trogocytosis and cooperative killing regulate tumour antigen escape. *Nature* 2019 ; 568 (7750) : 112-6.
- [11] Fischer J, Paret C, El Malki K, et al. CD19 Isoforms enabling resistance to CAR T-19 immunotherapy are expressed in B-ALL patients at initial diagnosis. *J Immunother* 2017 ; 40 (5) : 187-95.
- [12] Ruella M, Xu J, Barrett DM, et al. Induction of resistance to chimeric antigen receptor T-cell therapy by transduction of a single leukemic B-cell. *Nat Med* 2018 ; 1.
- [13] Singh N, Lee YG, Shestova O, et al. Impaired death receptor signaling in leukemia causes antigen-independent resistance by inducing CAR T-cell dysfunction. *Cancer Discov* 2020 ; 10 (4) : 552-67.
- [14] Dufva O, Koski J, Maliniemi P, et al. Integrated drug profiling and CRISPR screening identify essential pathways for CAR T-cell cytotoxicity. *Blood* 2020 ; 135 (9) : 597-609.
- [15] Joyce JA, Fearon DT. T-cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* 2015 ; 348 (6230) : 74-80.
- [16] Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov* 2019 ; 18 (3) : 197-218.
- [17] Rossi JM, Galon J, Chang E, et al. Abstract CT153: pretreatment immunoscore and an inflamed tumor microenvironment (TME) are associated with efficacy in patients (Pts) with refractory large B cell lymphoma treated with axicabtagene ciloleucel (Axi-Cel) in ZUMA-1. *Cancer Res* 2019 ; 79 (Suppl\_13) : CT153.
- [18] Mueller KT, Waldron E, Grupp SA, et al. Clinical pharmacology of tisagenlecleucel in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2018 ; 24 (24) : 6175-84.
- [19] Park JH, Rivière I, Gonen M, et al. Long term follow-up of CD19 CAR therapy in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018 ; 378 (5) : 449-59.
- [20] Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2017 ; 377 (26) : 2531-44.
- [21] Kawalekar OU, O'Connor RS, Fraietta JA, et al. Distinct signaling of coreceptors regulates specific metabolism pathways and impacts memory development in CAR T-cells. *Immunity* 2016 ; 44 (2) : 380-90.
- [22] Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, et al. ASTCT consensus grading for cyto-

- kine release syndrome and neurologic toxicity associated with immune effector cells. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2019 ; 25 (4) : 625-38.
- [23] June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T-cell immunotherapy for human cancer. *Science* 2018 ; 359 (6382) : 1361-5.
- [24] Hunter BD, Jacobson CA. CAR T-cell associated neurotoxicity: Mechanisms, clinicopathologic correlates, and future directions. *J Natl Cancer Inst* 2019 ; 11.
- [25] Sommermeyer D, Hudecek M, Kosasih PL, et al. Chimeric antigen receptor-modified T-cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia* 2016 ; 30 (2) : 492-500.
- [26] Weber EW, Maus MV, Mackall CL. The emerging landscape of immune cell therapies. *Cell* 2020 ; 181 (1) : 46-62.
- [27] Fraietta JA, Nobles CL, Sammons MA, et al. Disruption of TET2 promotes the therapeutic efficacy of CD19-targeted T-cells. *Nature* 2018 ; 558 (7709) : 307-12.
- [28] Ghorashian S, Kramer AM, Onuoha S, et al. Enhanced CAR T-cell expansion and prolonged persistence in pediatric patients with all treated with a low-affinity CD19 CAR. *Nat Med* 2019 ; 25 (9) : 1408-14.
- [29] Feucht J, Sun J, Eyquem J, et al. Calibration of CAR activation potential directs alternative T-cell fates and therapeutic potency. *Nat Med* 2019 ; 25 (1) : 82-8.
- [30] Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature* 2017 ; 543 (7643) : 113-7.
- [31] Chen J, López-Moyado IF, Seo H, et al. NR4A transcription factors limit CAR T-cell function in solid tumours. *Nature* 2019 ; 567 (7749) : 530-4.
- [32] Lynn RC, Weber EW, Sotillo E, et al. c-Jun overexpression in CAR T-cells induces exhaustion resistance. *Nature* 2019 ; 576 (7786) : 293-300.
- [33] Ruella M, Kenderian SS, Shestova O, et al. The addition of the BTK inhibitor ibrutinib to Anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cells (CART19) improves responses against mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2016 01 ; 22 (11) : 2684-96.
- [34] Gauthier J, Hirayama AV, Purushe J, et al. Feasibility and efficacy of CD19-targeted CAR T-cells with concurrent ibrutinib for CLL after ibrutinib failure. *Blood* 2020.

- [35] Shah NN, Maatman T, Hari P, Johnson B. Multi targeted CAR T-cell therapies for B-cell malignancies. *Front Oncol* 2019 ; 9 : 146.
- [36] Kuhn NF, Purdon TJ, van Leeuwen DG, et al. CD40 ligand-modified chimeric antigen receptor T-cells enhance antitumor function by eliciting an endogenous antitumor response. *Cancer Cell* 2019 ; 35 (3) : 473-88.
- [37] Curran KJ, Seinstra BA, Nikhamin Y, et al. Enhancing antitumor efficacy of chimeric antigen receptor T-cells through constitutive CD40L expression. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2015 ; 23 (4) : 769-78.
- [38] Lai J, Mardiana S, House IG, et al. Adoptive cellular therapy with T-cells expressing the dendritic cell growth factor Flt3L drives epitope spreading and anti-tumor immunity. *Nat Immunol* 2020.
- [39] Stephan MT, Ponomarev V, Brentjens RJ, et al. T-cell encoded CD80 and 4-1BBL induce auto- and transcostimulation, resulting in potent tumor rejection. *Nat Med* 2007 ; 13 (12) : 1440-9.
- [40] Jacobson C, Westin J, Miklos D. Phase 1/2 primary analysis of ZUMA-6: axicabtagene ciloleucel (Axi-Cel) in combination with atezolizumab (Atezo) for the treatment of patients (Pts) with refractory diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). American Association for Cancer Research Virtual Annual Meeting I. 2020. Accessible from: bit.ly/3eZDfb4.
- [41] Rafiq S, Yeku OO, Jackson HJ, et al. Targeted delivery of a PD-1-blocking scFv by CAR T-cells enhances anti-tumor efficacy in vivo. *Nat Biotechnol* 2018 ; 36 (9) : 847-56.
- [42] Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, et al. Human CAR T-cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. *J Clin Invest* 2016 ; 126 (8) : 3130-44.
- [43] Sakemura R, Cox MJ, Hansen MJ, et al. Targeting cancer associated fibroblasts in the bone marrow prevents resistance to chimeric antigen receptor T-cell therapy in multiple myeloma. *Blood* 2019 ; 134 (Suppl\_1) <https://doi.org/10.1182/blood-2019-123277>.
- [44] Ying Z, Huang XF, Xiang X, et al. A safe and potent anti-CD19 CAR T-cell therapy. *Nat Med* 2019 ; 25 (6) : 947-53.
- [45] Brudno JN, Lam N, Vanasse D, et al. Safety and feasibility of anti-CD19 CAR T-cells with fully human binding domains in patients with B-cell lymphoma. *Nat Med* 2020 ; 26 (2) : 270-80.
- [46] Mestermann K, Giavridis T, Weber J, et al. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib acts as a pharmacologic on/off switch for CAR T-cells. *Sci Transl Med* 2019 ; 11 (499).