

# CRISPR-Cas9 jako nástroj v terapii nádorových onemocnění

## CRISPR-Cas9 as a Tool in Cancer Therapy

Zatloukalová P., Krejčíř R., Valík D., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

**Východiska:** Editace genomu využívající CRISPR-Cas9 se v průběhu krátké doby zařadila mezi základní metody biologického výzkumu. Tento nedávno objevený mechanismus adaptivní antivirové obrany bakterií se podařilo přizpůsobit potřebám vědy a učinit z něj tak neocenitelný nástroj v manipulaci s DNA. K rozšíření metody přispěla především její jednoduchost a spolehlivost, s jakou ji lze využít. Pod pojmem editace genomu rozumíme úpravy genomové DNA cílené s přesností na jeden pár bází. V jednoduchosti zaměření enzymu na cílovou sekvenci se CRISPR-Cas9 zásadním způsobem liší od předchozích technologií. Na poli výzkumu nádorových onemocnění umožnil CRISPR-Cas9 vývoj řady modelových systémů vhodných pro studium karcinogeneze a testování léčiv. Z terapeutického hlediska našel CRISPR-Cas9 uplatnění v oblasti imunoterapie, a to zejména při *ex vivo* genetických modifikacích T lymfocytů pacienta. **Cíl:** Terapeutický potenciál CRISPR-Cas9 v léčbě nádorových onemocnění se nyní snaží ověřit několik klinických studií. Na základě těchto studií jsme v článku shrnuli strategie použité při přípravě terapeutických nástrojů použitelných v protinádorové terapii. **Závěr:** Technologie CRISPR-Cas9 se ukazuje jako nepostradatelná v oblasti základního výzkumu při studiu funkce jednotlivých genů v procesu karcinogeneze. Využití metody v protinádorové terapii je více problematické. Před vlastní klinickou praxí je potřeba provést ještě řadu optimalizací týkajících se účinnosti, bezpečnosti a specifity CRISPR-Cas9.

### Klíčová slova

CRISPR-Cas9 – imunoterapie – klinická studie

### Summary

**Background:** Genome editing using CRISPR-Cas9 has become one of the basic methods of biological research over a short period of time. This recently discovered system of adaptive immunity of bacteria has been adapted to the needs of science and has become a valuable tool for DNA manipulation. Its simplicity and reliability have contributed to widespread use of the method. Genome editing refers to targeted modifications of genomic DNA with single base pair accuracy. CRISPR-Cas9 differs significantly from previous technologies in the simplicity of directing the enzyme to the target sequence. In the field of cancer research, CRISPR-Cas9 has enabled the development of a number of models for the study of carcinogenesis and drug testing. From a therapeutic point of view, CRISPR-Cas9 has been applied in the field of immunotherapy, especially in *ex vivo* genetic modifications of the T-cells of patients. **Aim:** Currently, several clinical trials are trying to verify the therapeutic potential of CRISPR-Cas9. Based on these studies, we have summarised the strategies used in the preparation of therapeutic tools useful in cancer therapy. **Conclusion:** CRISPR-Cas9 appears to be crucial in basic research, particularly in the study of the function of individual genes involved in carcinogenesis. However, it will still be necessary to optimise the efficacy, safety and specificity of CRISPR-Cas9 before it is used in clinical practice.

### Key words

CRISPR-Cas9 – immunotherapy – clinical trial

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

This work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Pavlína Zatloukalová, Ph.D.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie

Masarykův onkologický ústav

Žlutý kopec 7

656 53 Brno

e-mail: pavlina.zatloukalova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 4. 6. 2019

Přijato/Accepted: 6. 8. 2019

doi: 10.14735/amko20193513

## Úvod

Technologie editace genomu s využitím systému CRISPR-Cas9 je v biologickém výzkumu již natolik rozšířená, že bychom jen těžko hledali oblast, která ji nevyužívá. Přitom ještě před 10 lety byl pojem CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) známý jen úzkému okruhu mikrobiologů, kteří jej objevili jako systém adaptivní imunity bakterií. Když se však podařilo objasnit mechanismus, jakým CRISPR-Cas9 brání opakované infekci bakterie fágem, vyšel najevo obrovský potenciál tohoto systému pro vědu. V roce 2013 byl představen CRISPR-Cas9 optimalizovaný pro využití v lidských buňkách [1,2] a ihned se začal šířit do laboratoří po celém světě rychlostí typickou pro revoluční objevy, a to i navzdory skutečnosti, že tento nástroj nepřinesl v principu nic, čeho by nebylo možné dosáhnout pomocí dřívějších technologií. Systém CRISPR-Cas9 nebyl první a není jedinou technikou umožňující tzv. editaci genomu [3]. K jeho rozšíření přispěla především jednoduchost, s jakou jej lze používat. Jedná se o jednoduchou a spolehlivou metodu, která do té doby nebyla dostupná a s jejímž příchodem bylo možno naplno využít potenciál ostatních technologií.

Pod pojmem editace genomu rozumíme úpravy genomové DNA cílené s přesností na jeden pár bází. Přesnost je přitom klíčová a umožňuje zasahovat do DNA způsobem, kterým lze dosáhnout požadovaných změn. Na molekulární úrovni mají systémy pro editaci genomu podobu enzymů, které dokážou rozštěpit DNA v místě dané sekvence (jedná se tedy o nukleázy, konkrétně DNázy). Známe celou řadu nejrůznějších DNáz štěpících více či méně specifické sekvence DNA. O editaci genomu však mluvíme pouze tehdy, pokud využíváme enzymy, které jsou naprogramovatelné tak, aby specificky štěpily námi zvolenou libovolnou sekvenci. V jednoduchosti zaměření enzymu na cílovou sekvenci se tak CRISPR-Cas9 zásadním způsobem liší od předchozích technologií ZFN (zinc-finger nucleases) a TALEN (transcription activator-like effector nucleases) [3,4].

## Mechanismus editace genomu metodou CRISPR-Cas9

Systém CRISPR-Cas9 běžně používaný v laboratorní praxi se skládá ze dvou komponent – proteinu Cas9 (CRISPR associated protein 9) fungujícího jako nukleáza a specifické malé molekuly RNA nazývané se sgRNA (single-guide RNA). Ta se váže na Cas9 a odpovídá za jeho navedení na cílovou sekvenci. Na základě komplementarity bází mezi cílovou DNA a sgRNA dochází k rozpoznání sekvence a k jejímu následnému štěpení. Enzym Cas9 štěpí vždy jen takovou sekvenci, která je komplementární k jeho sgRNA. Vytvoření vhodné sgRNA představuje jednoduchou, rutinní záležitost a adaptace celého systému pro štěpení jakékoliv sekvence je nenáročná s ohledem na čas, materiál nebo know-how laboratoře [1].

CRISPR-Cas9 lze využít především k modulaci exprese genu, a to jak k aktivaci, tak jeho inhibici (schéma 1A) [5]. Vyřazení funkce genu v buňce můžeme dosáhnout pouhým rozštěpením řetězce DNA v místě vybraného genu. Dvouřetězcové zlomy v DNA jsou v lidské buňce nejčastěji opravovány pomocí mechanismu nehomologního spojování konců, které však vede často ke vzniku mutací v podobě krátkých inzercí nebo delecí v místě zlomu. Mutace pak mají za následek vznik nefunkčního genového produktu, a to jak na úrovni proteinu, tak nekódující RNA. Takto vyřazený gen nám umožňuje zkoumat jeho funkci v daném systému, např. jedná-li se o vyřazení onkogenu v nádorové buňce nebo o vyřazení nádorového supresoru v buňce zdravé.

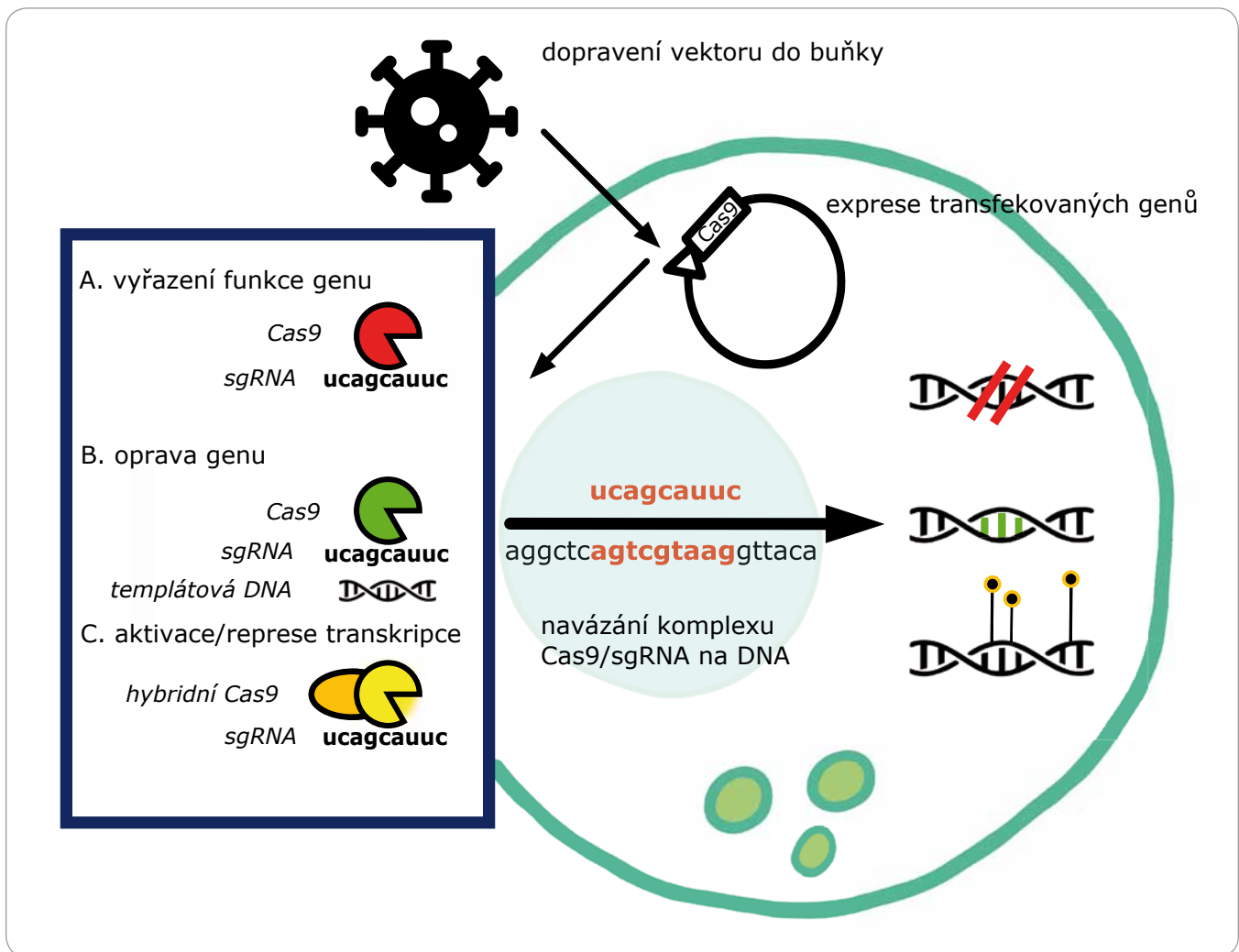
Štěpení DNA lze také využít k opravě vybraného genu (schéma 1B). Pomocí CRISPR-Cas9 lze přímo eliminovat genetické změny vedoucí k nekontrolované proliferaci či metastazování [6]. V určité fázi buněčného cyklu má buňka k dispozici další typ oprav, a sice opravu řízenou homologní sekvencí. V tomto případě buňka využije jako templát pro opravu dvouřetězcového zlomu druhý homologní chromozom a výsledkem je dokonale opravené vlákno v původní podobě. Tento mechanismus je ale možné využít i pro vnesení změn do sekvence DNA. Pokud

do buňky vneseme spolu se systémem CRISPR-Cas9 i krátkou molekulu DNA, která má sekvenci homologní s cílovým genem lišící se pouze v místě bodové mutace, kterou chceme opravit, může tato DNA posloužit jako templát a oprava povede k nahrazení původní nefunkční varianty funkční variantou genu [7]. Tato možnost je zajímavá především pro genovou terapii. Na rozdíl od dřívějších metod genové terapie nabízí CRISPR-Cas9 přímou opravu nefunkčního genu, a nikoli pouze vnesení kopie genu, která je navíc v buňce přítomna pouze po přechodnou dobu, nebo se náhodně začlení do genomové DNA.

Další možností využití CRISPR-Cas9 je cílená epigenetická editace (schéma 1C) umožňující měnit např. histonové modifikace či DNA metylace a tím ovlivňovat expresi proteinů [8]. Vezmeme-li v úvahu množství epigenetických faktorů zahrnutých do regulace nádorových onemocnění, mohlo by zaměření se na tyto regulační mechanismy znamenat významný pokrok v terapii nádorů. Základem tohoto systému je komplex Cas9/sgRNA, ve kterém mutantní Cas9 není schopen štěpit DNA, proto funguje dohromady se sgRNA pouze jako naváděcí DNA vazebná doména. Fúzním partnerem Cas9 je potom další protein se specifickou funkcí, kterou chceme aplikovat na vybrané místo v DNA. Může se jednat např. o enzymy modifikující chromatin, které ovlivňují genovou expresi, a tím umožňují zvýšit nebo snížit množství genového produktu v buňce.

## CRISPR-Cas9 v protinádorové terapii

Terapeutický potenciál CRISPR-Cas9 v oblasti protinádorové terapie byl potvrzen řadou *in vitro*, *in vivo* a *ex vivo* experimentů. Technologie CRISPR-Cas9 je nejvíce využívána v imunoterapii nádorových onemocnění, a to především v adoptivní imunoterapii, která je založená na izolaci pacientových T lymfocytů, jejich genetické modifikaci *ex vivo*, kultivaci a následném navrácení zpět do organismu, kde dojde k navození imunitní odpovědi v oblasti nádoru. Cílem genetických modifikací na T lymfocy-

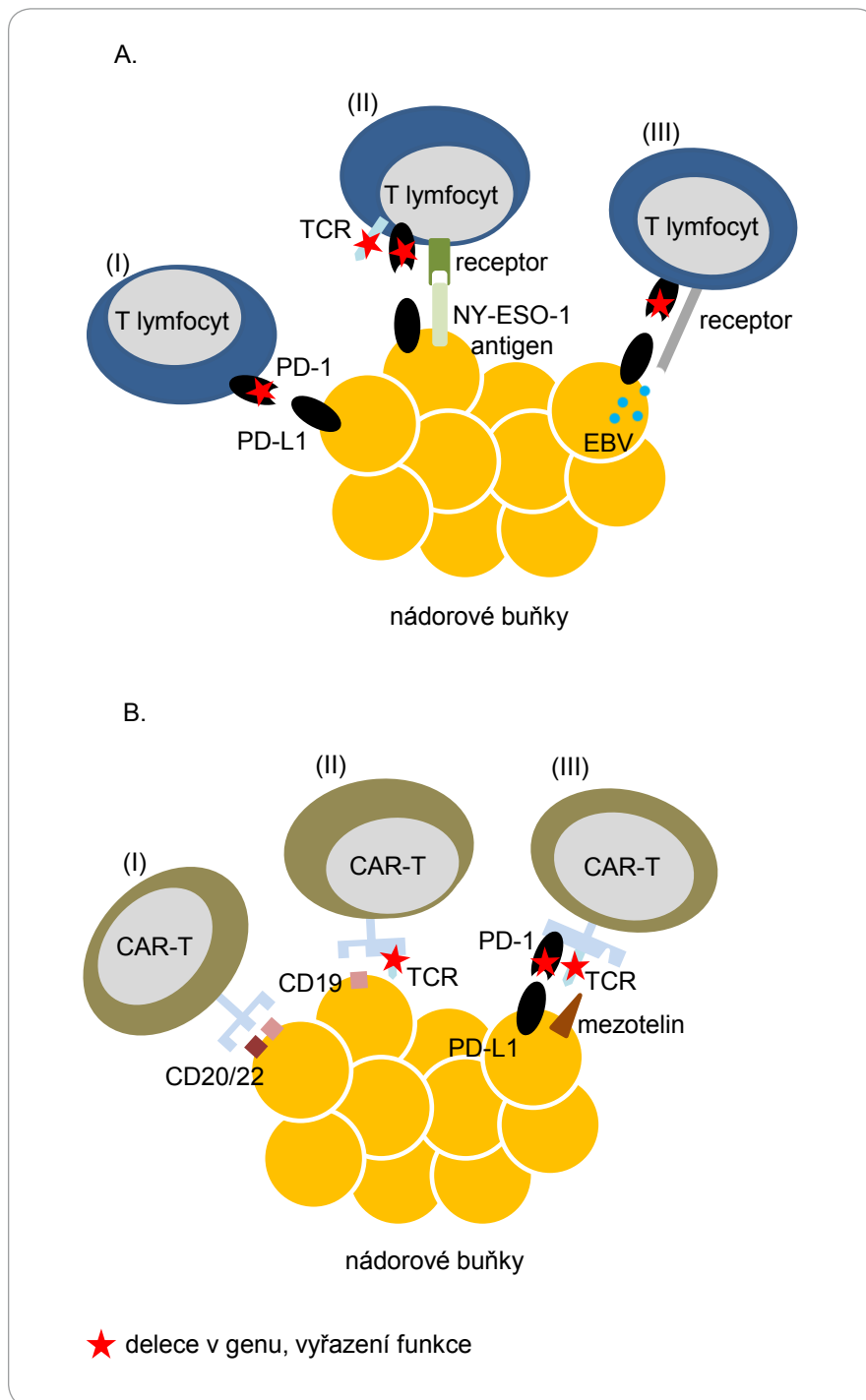


**Schéma 1. Schéma mechanismů editace genomu metodou CRISPR-Cas9.**  
 sgRNA – single-guide RNA

tech je upevnit specifitu a zvýšit jejich afinitu k danému nádorovému antigenu, aktivovat imunitní odpověď a zároveň omezit riziko vzniku imunitní reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host disease – GvHD). Rozsah imunitní reakce je závislý na interakci řady různých receptorů a ligandů, které zesilují či tlumí procesy aktivace T lymfocytů. Důležitou roli v potlačení imunitní odpovědi v nádorovém mikroprostředí hrají tzv. kontrolní body imunitního systému. Za jeden z nich je považovaná interakce PD-1/PD-L1, která navozuje funkční inaktivitu lymfocytů, a tím chrání organismus před vznikem autoimunitních onemocnění [9]. Tato interakce přispívá k „vyčerpání“ (exhausting) efektorových lymfocytů, které nejsou schopné speci-

fické cytotoxické odpovědi a destrukce cílových buněk [10], což může naopak také vést k navození nádorové tolerance. K jejímu vzniku přispívá především exprese PD-L1 na povrchu nádorových buněk. Jednou z možností imunoterapie je vyřazení kontrolního bodu PD-1, a tím navození vyšší aktivity imunitního systému. Je nutno zmínit, že v současné době existují monoklonální protilátky blokuující receptor PD-1, ale i ligand PD-L1, které byly schváleny k léčbě pokročilého metastazujícího melanomu, renálního karcinomu a nemalobuněčného karcinomu plic [11,12]. T lymfocyty modifikované CRISPR-Cas9 s vyřazeným PD-1 byly použity v probíhající klinické studii (NCT02793856) (schéma 2A) provedené u pacientů s nemalobuněč-

ným karcinomem plic, u kterých selhala standardní léčba a u kterých byla zjištěna zvýšená exprese PD-L1 na nádorových buňkách. Jedná se o první studii, u které byly získány výsledky z CRISPR-Cas9 terapie. Studie je zaměřená na zhodnocení bezpečnosti a definování maximální tolerované dávky po implantaci autologních T lymfocytů modifikovaných CRISPR-Cas9 s vyřazeným PD-1 (PD-1<sup>-/-</sup> T). Studie se zúčastnilo devět pacientů, dokončilo ji osm z nich. Pacienti byli zařazeni do tří skupin, s eskalací dávky  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  a  $4 \times 10^7$  PD-1<sup>-/-</sup> T/kg ve dvou cyklech. Z nežádoucích účinků bylo nejzávažnější nadměrné pocení (hyperhidróza) dosahující stupně 3. Dále u pacientů docházelo ke zvýšené aktivitě jaterních transamináz (ALT/AST),



**Schéma 2. Schéma terapeutické strategie.**

A. CRISPR-Cas9 geneticky modifikované T lymfocyty (I) s vyřazeným PD-1, (II) s vyřazeným PD-1 a TCR a s modifikovaným receptorem selektivně se vázající na antigen NY-ESO-1, (III) s vyřazeným PD-1 a specifický se vázající k buňkám infikovaným EBV.

B. CAR-T lymfocyty (I) specifické k CD19 a CD20/22, (II) s vyřazeným TCR a specifické k CD19, (III) s vyřazeným TCR a PD-1 a specifické k mezotelinu.

TCR – T buněčný receptor, CAR – chimérický antigenní receptor

trombocytopenii, únavě či horečce, vše hodnoceno v mírné až střední závažnosti (stupeň 1–2). Jeden pacient trpěl

srdeční arytmii stupně 1, a to po dobu 42,4 týdne. Sedm pacientů odpovídalo na průběh léčby. U dvou bylo onemoc-

nění stabilizováno po dobu 18–22 týdnů a zároveň byla zjištěna větší diverzita T lymfocytů než u dalších pěti pacientů, u kterých došlo k progresi onemocnění. Kontrola onemocnění (disease control rate – DCR) po 8 týdnech byla zaznamenána ve 28,6 % a medián přežití bez progresu (progression-free survival – PFS) byl 7,6 týdne. Závěrem studie bylo konstatováno, že terapie PD-1<sup>-/-</sup> T se zdá být bezpečná. Čtyři další klinické studie využívající obdobný koncept delecce PD-1 na autologních T lymfocytech byly registrovány při léčbě rakoviny prostaty (NCT02867345), močového měchýře (NCT02863913), jícnu (NCT03081715) a ledvin (NCT02867332). V další klinické studii (NCT03399448) (schéma 2A<sup>II</sup>) je testováno využití T lymfocytů nesoucích tři různé genetické modifikace indukované CRISPR-Cas9 v léčbě mnohočetného myelomu, synoviálního sarkomu, myxoidního liposarkomu a melanomu. Kromě omezení exprese PD-1 bude vyřazena také část T buněčného receptoru (T-cell receptor – TCR) a vnesen modifikovaný receptor selektivně se vázající na antigen NY-ESO-1 exprimovaný na nádorových buňkách. Vyřazení TCR by mělo napomoci snížit riziko vzniku GvHD. Další klinická studie fáze I/II (NCT03044743) (schéma 2A<sup>III</sup>) je registrována pro léčbu malignit asociovaných s virem Epstein a Barrové, u nichž velmi často dochází ke zvýšené expresi PD-L1. Ve studii budou využity T lymfocyty modifikované CRISPR-Cas9 s vyřazeným PD-1, které jsou specifické k buňkám infikovaným virem Epstein a Barrové. Jak již bylo zmíněno výše, k inhibici interakce PD-1/PD-L1 jsou v současné době využívány monoklonální protilátky. Přesto celý záměr s „nabuzením“ imunitního systému pomocí modifikovaných T lymfocytů vypadá velmi slibně a je další alternativou protinádorové terapie využitelnou v klinickém prostředí.

Další imunoterapeutická strategie je založena na využití modifikovaných T lymfocytů upravených *ex vivo* tak, aby exprimovaly chimérický antigenní receptor (chimeric antigen receptor – CAR). Ten je tvořen intracelulární doménou TCR, která vede k aktivaci T lymfocytů a spouští cytotoxickou odpověď, a extracelulární doménou spe-

cificky rozeznávající cílový antigen [13]. Výhodou těchto geneticky modifikovaných T lymfocytů je specifita vazby na cílový antigen bez nutnosti zpracování antigenu a jeho prezentace na hlavním histokompatibilním komplexu (major histocompatibility complex – MHC). Cílem je zajistit, aby tyto geneticky modifikované T lymfocyty rozpoznaly specifické antigeny vyskytující se na povrchu maligních buněk a eliminovaly je. Tato metodika se vyvíjí již více než 20 let [14]. V jejím průběhu vzniklo několik generací CAR a současně byly zdokonalovány metodiky bezpečného a účinného vložení CAR do autologních T lymfocytů. Původně byla používána transfekce DNA, dále pak transpozonové vektory obsahující element pro integraci, až po stabilní transdukcii T lymfocytů pomocí lentivirových vektorů [11]. Úspěšně byla testována specifita CAR-T lymfocytů k antigenu CD19, jehož exprese je omezena především na B lymfocyty a je ideálním cílovým antigenem pro hematologické malignity vycházející z B lymfocytární linie [12]. U řady pacientů velmi často dochází k relapsu onemocnění z důvodů ztráty CD19 na nádorových buňkách. Řešení nabízí probíhající klinická studie fáze I/II (NCT03398967) (schéma 2B<sup>I</sup>), jejímž úkolem je zhodnotit proveditelnost a bezpečnost terapeutického použití CRISPR-Cas9 pro přípravu modifikovaných CAR-T lymfocytů specifických k CD19 a CD20 nebo k CD19 a CD22 u pacientů s recidivující B lymfocytární leukémií nebo s maligním B lymfomem. CD20 nebo CD22 jsou další antigenní struktury exprimované na povrchu B lymfocytů a CAR-T lymfocyty afinitní k těmto antigenům by napomohly rozpoznat nádorové buňky, u kterých došlo ke ztrátě CD19, a to rozpoznáním znaků CD20 nebo CD22.

Většina CAR-T lymfocytů je připravena z T lymfocytů jednotlivých pacientů, čímž se terapie výrazně prodlužuje a finančně prodražuje. Možností je příprava univerzálních CAR-T lymfocytů, u nichž však dochází ke zvýšení rizika vzniku GvHD. Riziko GvHD bylo výrazně sníženo u CAR editovaného pomocí CRISPR-Cas9 do receptorů  $\alpha\beta$  TCR (tvořen polypeptidovými řetězci  $\alpha$  a  $\beta$ ) [15], které rozeznávají výhradně antigeny prezentované

na povrchu MHC molekul. V probíhající klinické studii (NCT03166878) (schéma 2B<sup>II</sup>) jsou testovány CAR-T lymfocyty specifické k CD19 a s vyřazeným TCR. Cílem je zjistit, zda tyto genetické modifikace T lymfocytů snižují riziko vzniku GvHD bez omezení terapeutického účinku u pacientů s recidivující B lymfocytární leukémií nebo s maligním B lymfomem. V další probíhající klinické studii (NCT03545815) (schéma 2B<sup>III</sup>) jsou testovány CAR-T lymfocyty s CRISPR-Cas9 vyřazeným TCR a PD-1 (nebo CTLA-4), které se specificky vážou k mezotelinu, který je považován za povrchový antigen s vysokou expresí u řady solidních nádorů [16]. Vyřazení PD-1 nebo CTLA-4 (další kontrolní bod imunitního systému) napomáhá utlumit inhibiční mechanizmy imunitního systému a podpořit jeho nabuzení v hostitelském prostředí [17].

Jediná registrovaná *in vivo* studie (NCT03057912) plánuje využít CRISPR-Cas9 k léčbě cervikálních intraepiteliálních neoplazií (CIN), které mohou vést zejména ke vzniku karcinomu děložního hrdla u žen. Hlavním kauzálním faktorem je infekce vysoce rizikovými lidskými papilomaviry (human papillomavirus – HPV), nejčastěji HPV16 a HPV18, u nichž v průběhu karcinogeneze dochází ke zvýšené expresi onkoproteinů E6 a E7. Cílem studie je eliminovat HPV přímo uvnitř lidského těla. Ženám ve věku 18–50 let s lehkou dysplazií (CIN I) a pozitivní HPV infekcí bude 2× týdně po dobu 4 týdnů aplikován na infikovaný čípek gel nesoucí konstrukty CRISPR-Cas9, které byly navrženy tak, aby omezily expresi virových proteinů E6 a E7 a tím zabránily maligní transformaci.

### Závěr

Studie týkající se úprav genomu byly prováděny již od 80. let minulého století a byly víceméně neúspěšné. Jednak manipulace s DNA byly ještě do nedávna finančně i technicky náročné, navíc se požadované úseky DNA do genomu začleňovaly náhodně a nebylo možné ovlivnit, zda v cílovém místě dojde k poškození životně důležitého genu nebo nádorového supresorového genu, jehož ztráta by podpořila proces maligní transformace. Technologie editace genů zalo-

žená na CRISPR-Cas9 se tak ukázala nepostradatelnou pro vědecký pokrok. Je široce využitelná především v základním výzkumu při studiu funkce jednotlivých genů v procesu karcinogeneze. Jako více problematické se jeví využití CRISPR-Cas9 v protinádorové terapii. Je nutno podotknout, že před samotným využitím v klinické praxi bude ještě potřeba provést řadu optimalizací týkajících se účinnosti, bezpečnosti a specifčnosti metody. Budoucnost bude do značné míry záviset na schopnosti vyvinout nové varianty Cas9 stoprocentně specifické k cílové sekvenci a neovlivňující jiné buněčné procesy. V případě manipulace s buněčnými liniemi je možné tolerovat určité procento nespecifických interakcí, pokud však pracujeme s buňkami člověka/pacienta, jde o závažnou komplikaci. Bude nezbytně nutné zlepšit vnesení CRISPR-Cas9 do organismu v případě terapií *in vivo*. Nové možnosti se také otevírají v léčbě monogenně podmíněných dědičných chorob. V dnešní době již probíhá řada klinických studií hodnotících protinádorovou terapii založenou na CRISPR-Cas9 modifikacích T lymfocytů pacienta *ex vivo*. Netrpělivě jsou proto očekávány jejich výsledky, které by ujasnily možnosti využití tohoto přístupu v klinické praxi.

### Literatura

- Cong L, Ran FA, Cox D et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339(6121): 819–823. doi: 10.1126/science.1231143.
- Lander ES. The Heroes of CRISPR. *Cell* 2016; 164(1–2): 18–28. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.041.
- Gupta RM, Musunuru K. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *J Clin Invest* 2014; 124(10): 4154–4161. doi: 10.1172/JCI72992.
- Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun* 2018; 9(1): 1911. doi: 10.1038/s41467-018-04252-2.
- Chen B, Gilbert LA, Cimini BA et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell* 2013; 155(7): 1479–1491. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.001.
- Shachaf CM, Kopelman AM, Arvanitis C et al. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature* 2004; 431(7012): 1112–1117. doi: 10.1038/nature03043.
- Rouet P, Smith F, Jasin M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol* 1994; 14(12): 8096–8106. doi: 10.1128/mcb.14.12.8096.
- Klann TS, Black JB, Chellappan M et al. CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. *Nat Biotechnol* 2017; 35(6): 561–568. doi: 10.1038/nbt.3853.

9. Zatloukalova P, Pjehova M, Babcanova S et al. The role of PD-1/PD-L1 signaling pathway in antitumor immune response. *Klin Onkol* 2016; 29 (Suppl 4): 72–77. doi: 10.14735/amko20164S72.
10. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 439(7077): 682–687. doi: 10.1038/nature04444.
11. Biffi A, Bartolomea CC, Cesana D et al. Lentiviral vector common integration sites in preclinical models and a clinical trial reflect a benign integration bias and not oncogenic selection. *Blood* 2011; 117(20): 5332–5339. doi: 10.1182/blood-2010-09-306761.
12. Park JH, Geyer MB, Brentjens RJ. CD19-targeted CAR T-cell therapeutics for hematologic malignancies: interpreting clinical outcomes to date. *Blood* 2016; 127(26): 3312–3320. doi: 10.1182/blood-2016-02-629063.
13. Xia AL, Wang XC, Lu YJ et al. Chimeric-antigen receptor T (CAR-T) cell therapy for solid tumors: challenges and opportunities. *Oncotarget* 2017; 8(52): 90521–90531. doi: 10.18632/oncotarget.19361.
14. Eshhar Z, Waks T, Gross G et al. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(2): 720–724. doi: 10.1073/pnas.90.2.720.
15. 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): 113–117. doi: 10.1038/nature21405.
16. Tang Z, Qian M, Ho M. The role of mesothelin in tumor progression and targeted therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2013; 13(2): 276–280.
17. Ren J, Zhang X, Liu X et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. *Oncotarget* 2017; 8(10): 17002–17011. doi: 10.18632/oncotarget.15218.