

POTENSI CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR T CELL (CAR-T CELL) DENGAN TARGET PROSTATE- SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN (PSMA) TERMODIFIKASI CRISPR/CAS9 SEBAGAI TERAPI KANKER PROSTAT

Ali Habibi¹, Siti Zulaikha Risqiyani¹, Dwi Ari Santi Putri²

¹Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember, Jember

ABSTRAK

Korespondensi:

Ali Habibi

Email author:

alissega21@gmail.com

Riwayat Artikel

Diterima: 12 Maret 2021
Selesai revisi: 5 Juni 2021

DOI :

10.53366/jimki.v9i1.321

Pendahuluan: Kanker prostat merupakan keganasan sel-sel prostat yang menjadi salah satu keganasan tersering pada pria dengan prevalensi 137,9 kasus baru per 100.000 pria tiap tahunnya. Salah satu pekerjaan yang memiliki risiko tinggi terhadap kejadian kanker prostat adalah petani karena diakibatkan paparan pestisida dan zat berbahaya lainnya. Saat ini, *Androgen Deprivation Therapy* (ADT) masih menjadi terapi yang banyak digunakan. Namun, ADT dapat menurunkan libido, impotensi, *hot flashes*, dan peningkatan risiko patah tulang. Karena beberapa kelemahan dari terapi ADT, maka diperlukan inovasi terapi untuk kanker prostat.

Metode: Proses pencarian literatur yang relevan kami lakukan menggunakan metode PRISMA dengan kata kunci yang telah ditetapkan sebelumnya. Dari 94 jurnal yang telah ditelaah, 64 jurnal diantaranya dianggap sesuai dengan topik bahasan dan digunakan sebagai referensi.

Hasil dan Pembahasan: *CAR-T Cell* termodifikasi CRISPR/Cas9 terbukti efisien dan efektif meningkatkan fungsi *CAR-T Cell* pada uji *in vitro* dan *in vivo*. Mekanisme immunosupresif yang diakibatkan oleh ikatan *programmed cell death protein 1* (PD-1) dengan *Programmed Death-Ligand 1* (PD-L1) dapat dituntaskan dengan menggunakan metode CRISPR/Cas9-mediated anti PD-1 sehingga dapat mempertahankan aktivasi *CAR-T Cell*. Hal ini dibuktikan dengan peningkatan degranulasi *CAR-T Cell* dan *clearance* tumor pada uji *in vivo*.

Simpulan: *Chimeric Antigen Receptor T Cell (CAR-T Cell)* dengan target *Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)* termodifikasi CRISPR/Cas9 berpotensi sebagai inovasi terapi yang efektif pada kanker prostat.

Kata Kunci: *Chimeric Antigen Receptor T Cell (CAR-T Cell)*, CRISPR/Cas9, *Prostate Cancer*, dan *Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)*

THE POTENTIAL OF CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR T CELL (CART-T CELL) TARGETTING PROSTATE-SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN (PSMA) MODIFIED BY CRISPR/CAS9 AS PROSTATE CANCER THERAPY

ABSTRACT

Introduction: Prostate cancer is a malignancy of prostate cells which is one of the most common malignancies in men with a prevalence of 137.9 new cases per 100,000 men each year. One of the jobs that have a high risk of prostate cancer is farmers because it is caused by exposure to pesticides and other hazardous substances. Currently, Androgen Deprivation Therapy (ADT) is still a widely used therapy. However, ADT can decrease libido, impotence, hot flashes, and an increased risk of fractures. Due to several disadvantages of ADT therapy, therapeutic innovations for prostate cancer are needed.

Method: We searched relevant literature using the PRISMA method with predefined keywords. Of the 94 journals that have been reviewed, 64 of them are considered according to the topic of discussion and are used as references.

Results and Discussion: CAR-T Cell modified CRISPR/Cas9 proved to be efficient and effective in increasing the function of CAR-T Cell on *in vitro* and *in vivo* tests. The immunosuppressive mechanism caused by PD-1 binding with PD-L1 can be resolved using the CRISPR / Cas9-mediated anti PD-1 method so that it can maintain CAR-T Cell activation. This is evidenced by the increase in CAR-T cell degranulation and tumor clearance in the *in vivo* test.

Conclusion: Chimeric Antigen Receptor T Cell (CAR-T Cell) with a CRISPR/Cas9 modified Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) target has the potential to be an effective therapeutic innovation for prostate cancer.

Keywords: Chimeric Antigen Receptor T Cell (CAR-T Cell), CRISPR/Cas9, Prostate Cancer, and Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)

1. PENDAHULUAN

Kanker prostat merupakan keganasan pada sel-sel prostat yang ditandai dengan peningkatan serum *prostate specific antigen* (PSA) dan keabnormalan colok dubur yang dipastikan dengan pemeriksaan biopsi prostat, *transrectal ultrasonography* (TRUS), *prostate cancer gene 3* (PCA3), dan *magnetic resonance imaging* (MRI).^[1,2,3] Kanker prostat menyumbang 16% kematian di Indonesia.^[4] Kanker prostat adalah salah satu keganasan tersering pada pria dengan 137,9 kasus baru per 100.000 pria tiap tahunnya.^[5,6,7] Prevalensi kanker prostat di seluruh dunia pada tahun 2018 mencapai 1.276.106 kasus dengan kematian sebanyak 358.989.^[6,8,9] Sampai tahun 2040, diperkirakan akan ada kasus baru sebanyak 2.293.818 kasus.^[9,10] Di Indonesia, jumlah penderita kanker prostat di tiga rumah sakit pusat pendidikan (Jakarta, Bandung, Surabaya) selama 8 tahun terakhir yaitu 1.102 pasien dengan bentuk terseringnya adalah adenokarsinoma.^[11,12]

Beberapa mekanisme telah diajukan untuk menjelaskan perkembangan kanker akibat pestisida. Kebanyakan pestisida tidak bersifat mutagenik. Namun, pestisida mungkin mengandung *endocrine disruptors* yang bisa memblokir ataupun merangsang reseptor hormonal dan menyebabkan peningkatan testosteron. Namun, bukti dari studi epidemiologi, tidak dapat membuktikan dengan pasti bahwa paparan *endocrine disruptors* atau kadar androgen endogen yang bersirkulasi berhubungan dengan peningkatan risiko kanker prostat. Selain itu, penelitian pada hewan dan jaringan telah menunjukkan bahwa salah satu jenis pestisida yaitu karbamat, dapat menyebabkan kerusakan kromosom. Selain itu,

pestisida juga dapat menyebabkan stres oksidatif yang dapat merusak sel.^[13]

Pekerjaan petani memiliki risiko tinggi terhadap beberapa paparan berbahaya, seperti debu organik dan anorganik, pestisida, jamur, mikroba, virus, bensin, knalpot diesel, asap pengelasan, dan sinar ultraviolet^[13] yang dapat dikaitkan dengan beberapa jenis kanker, termasuk kanker prostat.^[14] Sejak tahun 1970-an, banyak penelitian melaporkan risiko kanker prostat yang signifikan pada petani dibandingkan dengan pekerjaan lain.^[13] Laporan terbaru dari Studi Kesehatan Pertanian (AHS), sebuah kelompok besar pengguna pestisida dan pasangan mereka, terkonfirmasi bahwa pestisida tertentu menjadi faktor utama risiko kanker yang diamati pada populasi pertanian.^[15]

Penderita kanker prostat perlu dikelompokkan menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok dengan risiko rendah, risiko menengah, dan risiko tinggi. Pengelompokan risiko dilakukan untuk menentukan jenis pengobatan kanker. Pengobatan kanker yang dimaksud terdiri dari observasi, operasi, radiasi, atau pengobatan paliatif dengan memberikan obat antihidrogen.^[16] Selama dekade terakhir ini, pengobatan kanker prostat telah berubah dengan terapi baru, pencitraan fungsional tingkat lanjut dan pembaruan dari terapi yang ada pada tahap awal.^[17] Terdapat beberapa faktor yang memengaruhi keberhasilan terapi, yaitu stadium, komorbiditas, dan *grading*. Faktor-faktor risiko ini perlu dikenali dan dikelola dengan baik dan benar untuk memilih opsi perawatan yang tepat dan meminimalkan efek samping dan perbaikan kualitas hidup.^[18]

Terdapat banyak pengobatan baru untuk kanker prostat dengan imunoterapi, salah satunya yaitu sipuleucel-T (sip-T). Penggunaan imunoterapi berpotensi untuk

meningkatkan kelangsungan hidup bagi pasien kanker prostat metastatik dengan melibatkan sistem kekebalan untuk menyerang sel-sel tumor.^[19] Akan tetapi, terapi ini menimbulkan efek samping, seperti flu dan demam sebagai efek samping yang paling umum. Efek samping yang lebih serius jarang terjadi. Kadang-kadang sistem kekebalan tubuh mulai menyerang bagian lain dari tubuh yang dapat menyebabkan masalah serius di paru-paru, usus, hati, kelenjar pembuat hormon, ginjal, atau organ lain.^[20]

Dari studi sebelumnya menyatakan selain imunoterapi, *Androgen Deprivation Therapy* (ADT) masih menjadi strategi terapi yang banyak digunakan dalam praktik klinis yang bekerja dengan cara menghalangi efek androgen dan dapat memperlambat pertumbuhan kanker prostat.^[17] *Androgen Deprivation Therapy* sejauh ini menjadi standar terapi dan biasanya berlanjut seumur hidup untuk pasien dengan kanker prostat metastatik. Perkembangan *Androgen Deprivation Therapy* (ADT) untuk *metastatic castration-resistant prostate cancer* (mCRPC) diobati dengan penambahan manipulasi hormonal sekunder, termasuk antiandrogen seperti bicalutamide dan nilutamide, ketoconazole, atau kortikosteroid.^[17] Namun, ADT dapat menurunkan libido, impotensi, *hot flashes*, osteopenia dengan peningkatan risiko patah tulang.^[21] Karena beberapa kelemahan dari terapi ADT, maka diperlukan inovasi terapi untuk kanker prostat, salah satunya dengan *Chimeric Antigen Receptor T cell* (CAR-T) dengan target Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) termodifikasi CRISPR/Cas9.

Terapi *Chimeric Antigen Receptor T cell* (CAR-T) telah mendapatkan perhatian besar karena keunggulan CAR-T dalam pengobatan tumor ganas pada sistem peredaran

darah. Teknologi CAR-T memberikan cara baru untuk terapi tumor ganas, termasuk kanker prostat.^[22] CAR adalah protein transmembran yang disintesis, yang dapat mengenali antigen target yang diekspresikan dalam sel tumor melalui pemrograman ulang genetik. Teknologi transfer gen ini dapat memperkenalkan gen yang mengkode CARs ke dalam sel imun secara efisien.^[23] CAR-T membutuhkan receptor transmembran spesifik untuk dikenali, salah satunya adalah PSMA (*Prostate-specific membrane antigen*).^[22]

PSMA (*Prostate-specific membrane antigen*) adalah glikoprotein transmembran tipe II yang diekspresikan pada membran sel epitel prostat. *Prostate-Specific Membrane Antigen* (PSMA) juga diekspresikan pada membran ovarium dan sel payudara dalam kadar yang rendah dan hampir tidak ada di usus, hati, membran sel ginjal, tetapi tinggi dalam jaringan prostat dan pembuluh darah tumor. Dengan demikian, PSMA memiliki spesifisitas jaringan prostat yang baik. Selain itu, PSMA dapat berfungsi sebagai reseptor untuk melakukan pensinyalan untuk meningkatkan migrasi sel dan mengatur stabilitas kromosom. Oleh karena itu, PSMA merupakan target antigen yang menjanjikan untuk terapi kanker prostat.^[22]

Salah satu mekanisme dimana kanker dapat menghambat fungsi dari sel T yaitu melalui mekanisme immunosupresif dengan mengekspresikan *inhibitory ligand* seperti PD-L1 pada sel kanker dan jaringan di sekitarnya (misalnya stroma atau tumor pembuluh darah) ekspresi protein PD-1 pada sel T dan protein PD-L1 pada sel kanker berkorelasi dengan prognosis yang buruk pada beberapa kanker. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa metode *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Associated with Cas9 protein* (CRISPR/Cas9) dapat digunakan untuk menghilangkan

mekanisme munosupresif yang dapat meningkatkan prospek terapi CAR-T melalui modifikasi gen.^[24] CRISPR/Cas9 merupakan metode *genome editing* yang memiliki tingkat kespesifikan yang tinggi, tidak melibatkan integrasi antar-DNA, dan dapat menargetkan lebih dari satu genom target.^[25] Oleh karena itu, untuk meningkatkan potensi dari *CAR-T Cell* pada terapi kanker prostat, kami mengajukan metode CRISPR/Cas9 untuk menghambat protein PD-1 pada *CAR-T Cell*, sehingga tidak bisa berikatan dengan protein PD-L1 pada sel tumor. Hal ini berefek pada *CAR-T Cell* menjadi tidak bisa dinonaktifkan.^[24,26]

2. METODE

Penulisan karya ilmiah tinjauan pustaka ini menggunakan metode PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systemic Reviews and Meta-Analyses*). PRISMA merupakan suatu studi pustaka yang didasarkan atas fakta-fakta serta pengambilan data secara random. Struktur yang digunakan dalam karya ilmiah ini mengaplikasikan: latar belakang, sasaran, sumber data, kriteria kelayakan jurnal, dan intervensi, *study appraisal* dan *synthesis methods*, hasil, batasan masalah, kesimpulan dan kata kunci, serta daftar pustaka. Penulis menggunakan *search engine* PubMed, ScienceDirect, GoogleScholar, Elsevier, Nature dengan kata kunci: "Prostate Cancer, Chimeric Antigen Receptor T Cell (*CAR-T Cell*), Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA), CRISPR/ Cas9, dan Agriculture". Jurnal ilmiah yang telah berhasil melewati kriteria inklusi dan eksklusi akan menjalani proses pemindaian kembali untuk mengetahui adanya publikasi tambahan mengenai kata kunci yang ditentukan. Jurnal ilmiah akan menjalani proses eksklusi jika tahun publikasi atau terbit jurnal telah melebihi 10 tahun, tidak relevan, dan bukan merupakan artikel *full-text*. Terdapat 94 artikel atau jurnal ilmiah yang sesuai dengan topik yang dibahas, tetapi hanya 65 jurnal yang memenuhi kriteria inklusi yang telah ditetapkan penulis.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

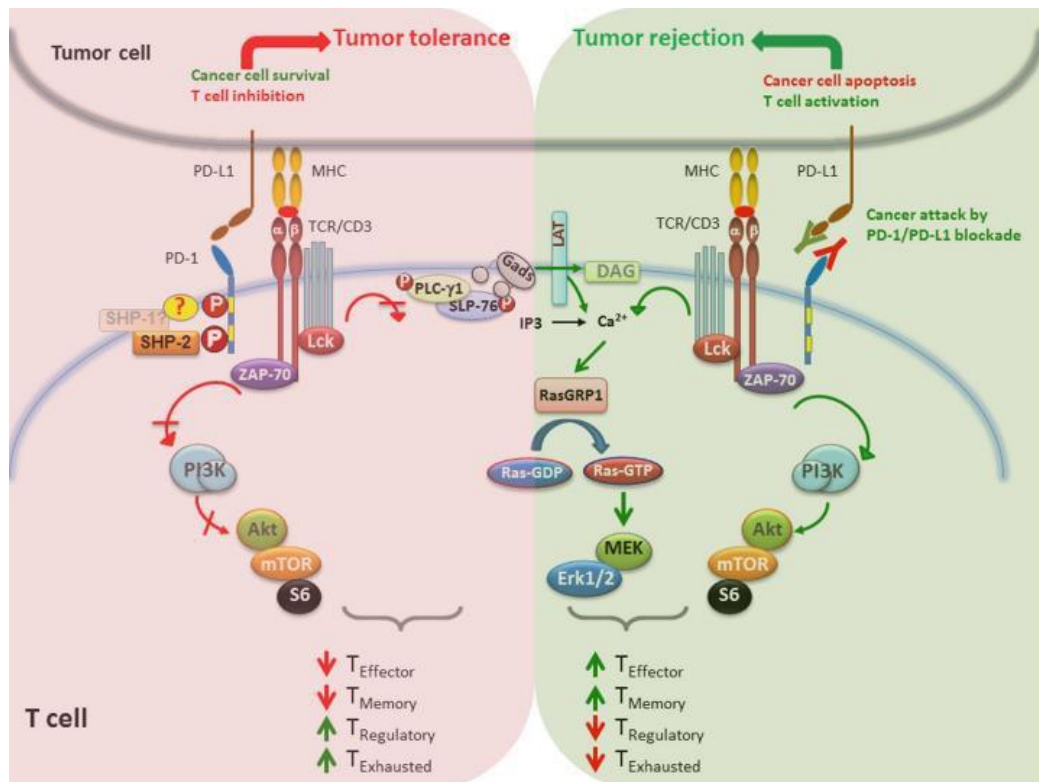
3.1 Patogenesis Kanker Prostat

Patogenesis yang berperan dalam kanker prostat diakibatkan oleh faktor androgen, hereditas, lingkungan, dan mutasi somatik.^[27] Androgen, terutama testosteron dan dihidrotestosteron, merupakan hormon penting untuk pertumbuhan dan fungsi prostat, namun juga berperan dalam progresivitas dan metastasis kanker.^[28,29] Paparan terhadap pestisida meningkatkan risiko kanker prostat melalui efek biologisnya dalam perubahan kadar dan fungsi hormon serta sebagai promotor tumor.^[30] Salah satu respon dari androgen dalam sel kanker prostat adalah meningkatkan regulasi dari *Transmembrane Serine Protease 2* (*androgen-responsive TMPRSS2*) yang diekspresikan pada sisi luminal epitel prostat.^[31] Gen *TMPRSS2* (*Transmembrane Serine Protease 2*) berfusi dengan *ERG* (*ETS-related gene*) atau *ETV1* (*Variant Transcription Factor 1*) yang merupakan faktor transkripsi *ETS* (*E26 Transformation-Specific family*) dan bersifat karsinogenik.^[32,33,34,35]

Riwayat keluarga dan latar belakang etnis sering diasosiasikan dengan peningkatan insiden kanker prostat sebagai predisposisi genetik dan herediter.^[36] Pada orang Amerika berkulit putih, terjadinya kanker prostat dikaitkan dengan suatu lokus pada kromosom 1q24-q25, sedangkan pada laki-laki keturunan Afrika, varian onkogen *MYC* pada kromosom 8q24 diduga sebagai penyebab peningkatan insidens kanker prostat.^[1] Mutasi sering mengakibatkan aktivasi *PI3K/AKT signaling pathway* yang bersifat onkogenik, di antaranya ialah mutasi yang menginaktivasi gen supresor tumor *PTEN* (*Phosphatase and Tensin Homolog deleted on Chromosome 10*), yang bertindak sebagai penghambat pada aktivitas *PI3K*.^[1,37] Perubahan struktural lainnya yang telah dikemukakan dalam kanker prostat yaitu fusi gen *ESRP1-RAF1* (*epithelial splicing regulatory protein-1-v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog-1*), *ETS family*, dan *RAF kinase*.^[27,38] Respon imun anti tumor, terutama sel T sitotoksik atau sel T *CD8+* memediasi eliminasi sel kanker

sehingga sel kanker tidak dapat berkembang dan bermetastasis.^[39] Pada kanker prostat tingkat lanjut, PD-1 *pathway* dan ligannya yaitu PD-L1 muncul sebagai mekanisme toleransi imun yang menyebabkan sel tumor

dapat menekan antitumor dengan cara menghambat fungsi efektor dan mengurangi efektivitas sel T (Lihat gambar 1).^[40,41] ositif PD-L1 sering dikaitkan dengan peningkatan risiko metastasis dan rekurensi.^[42,43]



Gambar 1. Blokade PD-1 / PD-L1 meningkatkan regresi dan rejeksi tumor dengan mengaktifkan sel T. (Kiri) Ketika jalur PD-1/PD-L1 aktif, maka akan meningkatkan progresivitas sel kanker melalui sinyal antiapoptotik yang dimediasi PD-L1 dan menghambat jalur pensinyalan yang mengaktifasi sel T (sel yang mengenali antigen tumor). Peristiwa ini menyebabkan rusaknya efektor T dan sel-sel memori serta diferensiasi sel TEX dan TReg, yang menyebabkan toleransi terhadap sel kanker. (Kanan) Berbeda dengan gangguan pensinyalan T-cell receptor (TCR) yang disebabkan oleh PD-1, blokade PD-1 / PD-L1 meningkatkan kapasitas sel T dengan cara mengaktifasi jalur PI3K/Akt atau Ras/MAPK, menyebabkan diferensiasi sel T efektor dan memori serta supresi dari diferensiasi TEX dan Treg^[44]

3.2 Chimeric Antigen Receptor T Cell (CAR-T Cell)

Terapi *Chimeric antigen receptor* (CAR-T) telah mendapatkan perhatian besar karena keunggulan sel-sel CAR-T dalam pengobatan tumor dan telah mendapat pengakuan besar atas hasil terapinya.^[22] *Chimeric antigen receptor* (CAR-T) merupakan metode transfer sel T yang direkayasa secara genetika dengan mengekspresikan *Chimeric Antigen Receptor* (CAR).^[45] Sel T yang telah direkayasa secara *ex vivo* nantinya akan diarahkan terhadap antigen spesifik pada sel tumor.^[46] CAR sebagai reseptor sintesis menggunakan *single-chain variable fragment* (scFv) dalam penargetan antigen permukaan sel.^[47] Fragmen scFv sendiri berperan sebagai *tumor-associated antigens receptor* (TAAs) atau reseptor antigen yang diekspresikan oleh sel-sel tumor. Selain fragmen scFv, terdapat beberapa komponen lain yang menjadi bagian reseptor CAR dalam sel T, yaitu domain transmembran dan *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAMs) yang merupakan bagian intraseluler.^[48,49] Zona transmembran terdiri dari CD3, CD8, CD28, atau Fc ϵ RI dan dapat memperbaiki scFv pada permukaan sel T dan mentransduksi sinyal ke dalam sel. Zona transduksi sinyal intraseluler terdiri dari CD8, CD28, atau CD137 dan CD3 ζ , yang berisi *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAMs).^[22]

3.3 Peran *Prostate-specific membrane antigen* (PSMA) sebagai Target *CAR-T Cell*

Dalam pengembangan terapi *CAR-T cell* dibutuhkan pengenalan tentang reseptor antigen tumor atau *tumor-associated antigens receptor* (TAAs). Antigen yang terkait dengan kanker prostat dapat berupa protein yang ada pada sel prostat. Contohnya adalah *prostate-specific antigen* (PSA), *prostate-specific membrane antigen* (PSMA), dan *prostate stem cell antigen* (PSCA).^[50] Antigen terkait tumor yang paling umum digunakan untuk kanker prostat terapi *CAR-T cell* adalah PSMA.^[22] Pada dua uji klinis fase 1, terapi *CAR-T cell* dengan target PSMA dinilai aman.^[51,52]

Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) memiliki berbagai nama lain, seperti glutamat karboksipeptidase II (GCP II), N-asetil-L-aspartil-L-glutamat peptidase I (NAALA Dase I), atau folat hidrolase, yaitu 100-kD glikoprotein transmembran tipe II golongan M28 peptidase. Protein PSMA memiliki glutamat carboxypeptidase aktif berperan untuk mengkatalisis neuropeptida N-asetil-L-aspartil-L-glutamat (NAAG) menjadi N-asetillaspartat (NAA) dan glutamate.^[53]

Beberapa molekul protein dan glikoprotein diekspresikan pada jaringan kanker prostat, yang berfungsi sebagai target untuk *CAR-T Cell* telah dijelaskan sebelumnya, seperti *prostate-specific antigen* (PSA), *prostate-specific membrane antigen* (PSMA), dan *prostate stem cell antigen* (PSCA). Reseptor CAR-T Cell dapat membaca frame protein, transient receptor potential-p8, dan enam *transmembrane epithelial antigen* pada sel prostat.^[54]

Prostate-specific membrane antigen (PSMA) merupakan salah satu protein transmembran yang dapat dikenali oleh *CAR-T Cell*. Ekspresi PSMA rendah pada sel ovarium dan sel payudara, tetapi tinggi dalam jaringan prostat.^[22,55] Antigen ini diekspresikan pada permukaan sel pada jaringan prostat normal dan diekspresikan berlebih pada kanker prostat. Ekspresi PSMA akan semakin meningkat sebanding dengan tingkat keparahan tumor. *Prostate-Specific Membrane Antigen* (PSMA) diakui sebagai target pada kanker prostat sekitar 3 dekade lalu ketika antibodi pertama pada domain intraseluler dikembangkan.^[56]

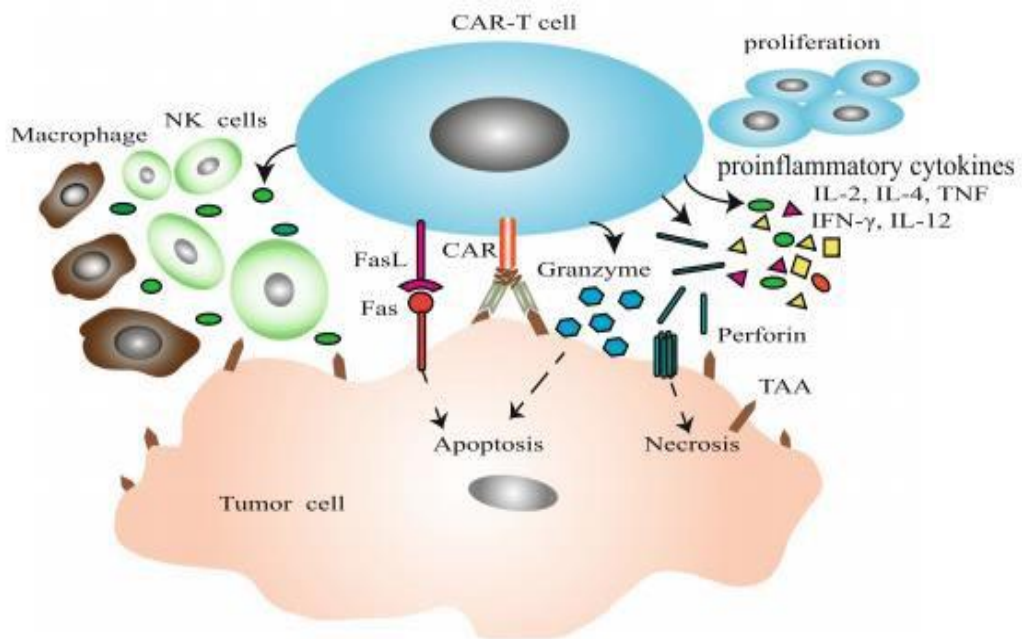
3.4 Mekanisme terapi *CAR-T Cell* sebagai antitumor

Sel-sel CAR-T dapat secara khusus mengenali antigen tumor dengan cara MHC-independen. Setelah CAR secara spesifik berikatan dengan TAA, sel T akan diaktifkan melalui fosforilasi *immune receptor tyrosine-based activation motifs* (ITAM) diikuti oleh peningkatan sitokin (termasuk IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-12, dan TNF) sekresi, proliferasi sel T, dan sitotoksitas. IL-12 dapat memperkuat fungsi sel imun bawaan seperti sel NK dan makrofag. Sel T dan CAR-T yang teraktivasi

melakukan sitotoksitas, terdapat 2 jalur, yaitu sekresi granula perforin dan granzyme, serta melalui jalur aktivasi reseptor sinyal yang menginduksi kematian sel melalui Fas/Fas-L (Lihat gambar 2).^[47]

Sel T yang termodifikasi CD40L mampu memberikan efek dengan meningkatkan proliferasi dan sekresi sitokin Th1 proinflamasi, termasuk IL-2, IFN- γ , IL-12, dan TNF. IL-12 berperan dalam peningkatan aktivasi sel T sitotoksik.^[57] IFN- γ yang disekresikan oleh sel CAR-T juga berkontribusi pada penghancuran sel tumor.^[55] Selain itu,

CD28 dijadikan sebagai co-stimulator dalam terapi CAR-T anti-PSMA generasi kedua yang diuji pada tikus, memiliki peran sangat penting untuk sekresi sitokin spesifik antigen dan proliferasi sel T. Sel-sel CAR-T generasi kedua menunjukkan efek merusak sel target yang lebih baik daripada generasi sebelumnya dan mewakili pendekatan target imun baru untuk mPCa.^[22,55] Efeknya, volume tumor menurun secara signifikan (berkurang setelah 3 minggu) pada tikus yang diinokulasi dengan sel CAR-T anti-PSMA.^[55,58]



Gambar 2, Mekanisme CAR-T Cell sebagai anti-tumor^[50]

3.5 Prinsip dan Mekanisme Kerja CRISPR/Cas9

Rekayasa genetik adalah teknologi yang sangat dibutuhkan dalam penelitian biologi dan aplikasi biomedis. Rekayasa genetik memungkinkan kita untuk mengubah sekuens genetik sesuai hati untuk mengatur informasi genetik fundamental dalam sel. Rekayasa ini telah diimplementasikan untuk studi fungsi gen atau genetika penyakit pada manusia, dan juga telah digunakan dalam terapi gen untuk memperbaiki perubahan genetik yang merugikan dan dapat memberi manfaat.^[59]

Prinsip dasar untuk proses ini dapat dibagi menjadi dua langkah. Langkah pertama adalah pengenalan DNA *cleavage* yang ditargetkan, dalam

bentuk *double strand breaks* (DSBs) atau *single strand nicks* (SSNs), melalui aktivitas *nucleases* atau *nicksases*. Langkah kedua melibatkan proses DNA *repair* yang diaktifkan oleh *cleavage* yang ditargetkan, yang dilakukan secara normal oleh *endogenous DNA damage repair machinery* di dalam sel.^[59]

Metode rekayasa genetik terbaru yang digunakan sebagai terapi gen adalah *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) dan *CRISPR-associated protein 9* (Cas9), yang merupakan sistem pertahanan pada bakteri *S. pyogen* dan telah terbukti bisa diterapkan pada sel manusia.^[60] CRISPR mengacu pada *sequences* dalam genom bakteri. Sedangkan *CRISPR-associated protein 9* (Cas9) adalah endonuklease yang memotong

kedua untai DNA. Cas9 diarahkan menuju target pada DNA oleh bagian RNA. RNA ini dapat disintesis sebagai untai tunggal yang disebut *synthetic single guide RNA* (sgRNA); bagian RNA yang berikatan dengan DNA genomik yang tersusun dari 18-20 nukleotida. Untuk memotong, urutan DNA spesifik harus terletak pada ujung 3' dari sgRNA, ini disebut *protospacer adjacent motif* (PAM).^[61] Proses perbaikan setelah pemotongan DNA dapat terjadi melalui dua jalur, yaitu *non-homologous end joining* (NHEJ), biasanya mengarah ke penyisipan/penghapusan bagian DNA, dan yang kedua adalah *homology directed repair* (HDR), di mana sepotong DNA homolog digunakan sebagai *template* perbaikan.^[61] Kelebihan mekanisme perbaikan DNA endogen seluler NHEJ dibanding dengan mekanisme endogen seluler lainnya seperti *Homology directed repair* (HDR) yang memerlukan template rantai DNA untuk melakukan perbaikan DNA adalah NHEJ bisa memperbaiki DNA melalui mutasi ketika sel sedang dalam fase membelah ataupun ketika sel dalam fase tidak membelah serta efektivitasnya yang lebih tinggi. Sedangkan HDR hanya mampu memperbaiki DNA yang terpotong ketika sel sedang dalam fase pembelahan G2 atau S.^[62]

3.6 Potensi CAR-T Cell Termodifikasi CRISPR/Cas9

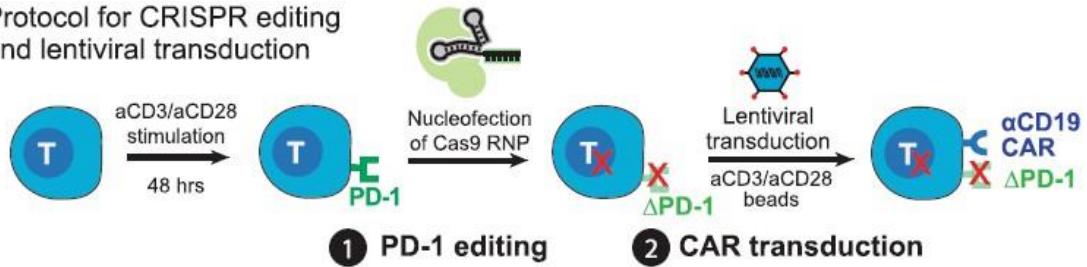
Sistem imun memainkan peran penting dalam perkembangan kanker. Dalam keadaan normal, sistem kekebalan tubuh dapat mengenali, mengontrol, dan bahkan menghilangkan tumor. Sel CD8+ adalah sel imun utama yang bertanggung jawab untuk membunuh sel tumor. Salah satu mekanisme yang digunakan oleh tumor adalah meningkatkan regulasi dari *Programmed Death-Ligand 1* (PD-L1), yang telah diidentifikasi sebagai indikator prognosis buruk pada beberapa jenis tumor.^[64]

Sel CD8+ mengekspresikan *programmed cell death protein 1* (PD-1) pada permukaannya, sedangkan PD-L1 diekspresikan oleh sebagian besar jenis sel, termasuk juga sel tumor. Ikatan PD-1 dengan PD-L1 memainkan peran penting dalam sistem kekebalan untuk menjaga toleransi imun dan respons

imun fisiologis yang seimbang. sel tumor dapat memanfaatkan jalur PD-1/PD-L1 untuk melemahkan aktivitas sel CD8+. PD-1 ketika berikatan dengan pada ligannya PD-L1, menghasilkan *inhibitory signals* untuk menekan aktivitas Sel CD8+.^[64] Begitu pula dengan *CAR-T cell* yang menunjukkan penurunan fungsi untuk terapi tumor sebagian karena efek supresif diakibatkan oleh ekspresi PD-1 mereka sendiri. Penurunan fungsi ini termasuk penurunan kemampuan sitotoksik dan sekresi sitokin *CAR-T Cell*.^[63] Untungnya, downregulasi yang diinduksi oleh tumor untuk fungsi *CAR-T Cell* dapat dituntaskan dengan menggunakan blokade PD-1 yang dapat mempertahankan aktivasi *CAR-T Cell* sebagai terapi tumor.^[65] Oleh karena itu, kombinasi *CAR-T Cell* dan PD-1 *inhibitor* dapat meningkatkan kontrol tumor dan kelangsungan hidup.^[64] Salah satu metode yang digunakan untuk blokade PD-1 adalah dengan metode lentivirus CRISPR/Cas9.

Gambar 3 menjelaskan protokol skematik produksi lentivirus CRISPR/Cas9. Untuk produksi lentivirus CRISPR/Cas9, *non-targeting guide RNA sequence* dan tiga *PD-1 guide RNA sequences* dirancang menggunakan program online <http://crispr.mit.edu>. *PD-1 guide RNA sequence* PD-1sg-1: aggcgcccctggccagtcgctc, PD-1sg-2: cgtctgggcggtgctacaac, PD-1sg-3: ctacaactgggctggcggcc dan *non-targeting control RNA sequence*: atcgtttccgctcg. Lentivirus diproduksi menggunakan *co-transfecting* sel 293T dengan kemasan vektor ps-PAX2, *envelope vektor* pCL-VSVG dan masing-masing vektor LentiCrispr V2. 24 jam setelah transfeksi, media kultur diubah menjadi RPMI disuplementasi dengan 10% FBS. Lentivirus dalam *supernatant* dikumpulkan 72 jam setelah transfeksi dan disaring melalui 0,45 µm *syringe filter*.^[64]

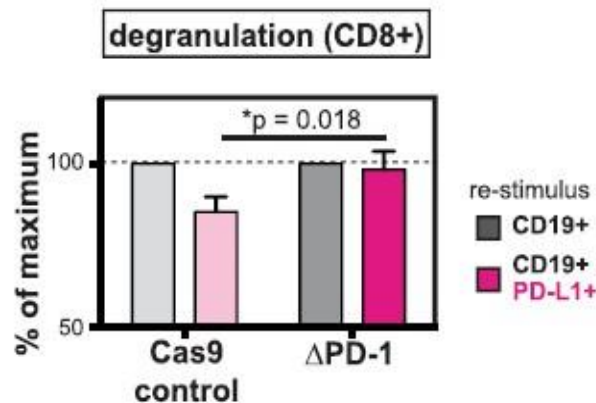
Protocol for CRISPR editing and lentiviral transduction



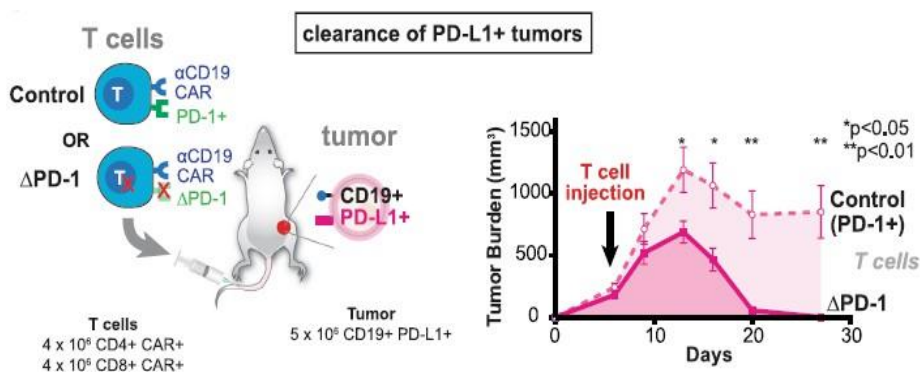
Gambar 3. Protokol skematik untuk modifikasi kombinasi gen CRISPR dan transduksi lentiviral pada sel CD8+ manusia.^[24]

Hasil dari *CAR-T Cell* termodifikasi CRISPR/Cas9 untuk blokade PD-1 menunjukkan hasil yang baik pada uji *in vitro* maupun uji *in vivo*. *CAR-T Cell* termodifikasi CRISPR/Cas9 menunjukkan peningkatan degranulasi

CAR-T Cell pada uji *in vitro* dibandingkan dengan *CAR-T Cell* tanpa modifikasi (Lihat gambar 4). Pada uji *in vivo*, *CAR-T Cell* termodifikasi CRISPR/Cas9 meningkatkan *clearance* tumor dengan signifikan (Lihat gambar 5).^[24]



Gambar 4. Blokade PD-1 pada CD8+ anti-CD19 *CAR-T Cell* (Δ PD-1) menunjukkan degranulasi yang lebih besar dibandingkan dengan kontrol CD8+ *CAR-T Cell*.^[24]



Gambar 5. *CAR-T Cell* termodifikasi CRISPR/Cas9-mediated anti PD-1 meningkatkan fungsi sel anti-CD19 *CAR-T Cell* dan meningkatkan *clearance* tumor *in vivo*.^[24]

4. SIMPULAN

Banyak peneliti telah melakukan uji coba pada metode dan mekanisme terapi kanker prostat. Salah satu metode yang paling mutakhir adalah terapi CAR-T Cell dengan target PSMA termodifikasi CRISPR/Cas9 yang dapat secara langsung menargetkan sel kanker prostat. Disrupsi PD-1 pada CAR-T Cell menggunakan metode CRISPR/Cas9 menunjukkan efek yang signifikan terhadap peningkatan degranulasi CAR-T Cell dan clearance tumor. Oleh karena itu, metode terapi ini berpotensi sebagai inovasi terapi yang efektif, efisien, dan dapat menjadi modalitas terapi pada kanker prostat.

5. SARAN

Untuk penelitian selanjutnya, diperlukan penelitian mengenai jumlah dosis CAR-T Cell termodifikasi CRISPR/Cas9-mediated anti PD-1 yang harus diinjeksi, efek sampingnya, efektivitas pada manusia, serta penggunaan terapi ini pada penyakit lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathology. Ninth Edit. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier; 1390. 668 p.
2. Mottet N, Bellmunt J, Briers E, Bergh RCN van den, Bolla M, Casteren NJ van, et al. Guidelines on Prostate Cancer [Internet]. European Association of Urology. 2015. 31-45 p. Available from: http://www.uroweb.org/fileadmin/tx_eauguidelines/2005/Pocket/Prostate_Cancer.pdf
3. Castillejos-molina RA, Gabilondonavarro FB. Prostate Cancer. *Salud Publica Mex*. 2016;58(2):279–84.
4. Baade PD, Youlten DR, Cramb SM, Dunn J, Gardiner RA. Epidemiology of prostate cancer in the Asia-Pacific region. *Prostate Int* [Internet]. 2013;1(2):47–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.12954/PI.12014>
5. Crawford ED, Petrylak D, Sartor O. Navigating the evolving therapeutic landscape in advanced prostate cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig* [Internet]. 2017;35(01):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2017.01.020>
6. Lawrenti H. Perkembangan Terapi Kanker Prostat. *CKD*. 2019;46(8):521–8.
7. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* [Internet]. 2019;144(8):1941–53. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30350310>
8. The Global Cancer Observatory G. Prostate 2018. World Health Organization. 2019.
9. Rawla P. Descriptive Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol*. 2019;10(2):63–89.
10. International Agency for Research on Cancer. Cancer Tomorrow. World Health Organization (WHO). 2019.
11. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Panduan Penatalaksanaan Kanker Prostat. Komite Penanggulangan Kanker Nasional. 2015. 47 p.
12. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Keputusan Menteri Kesehatan RI Nomor Hk.01.07/Menkes/291/2018 Tentang Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tata Laksana Kanker Prostat [Internet]. Komite Penanggulangan Kanker Nasional. Jakarta; 2018. 9-42 p. Available from: <http://kanker.kemkes.go.id/guidelines/PNPKProstat.pdf>
13. Krstev S, Knutsson A. Occupational Risk Factors for Prostate Cancer: A Meta-analysis. *J Cancer Prev*. 2019;24(2):91-111. doi:10.15430/JCP.2019.24.2.91
14. Silva JF, Mattos IE, Luz LL, Carmo CN, Aydos RD. Exposure to pesticides and prostate cancer: systematic review of the literature. *Rev Environ Health*. 2016;31(3):311-327. doi:10.1515/reveh-2016-0001
15. Kachuri L, Harris MA, MacLeod JS, Tjepkema M, Peters PA, Demers

- PA. Cancer risks in a population-based study of 70,570 agricultural workers: results from the Canadian census health and Environment cohort (CanCHEC). *BMC Cancer*. 2017;17(1):343. Published 2017 May 19. doi:10.1186/s12885-017-3346-x
16. Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2019Nov;69(5):363–85.
 17. Teo MY, Rathkopf DE, Kantoff P. Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annu Rev Med*. 2019;70:479-499. doi:10.1146/annurev-med-051517-011947
 18. Perdana NR, Mochtar CA, Umbas HR, Hamid ARAH. The Risk Factors of Prostate Cancer and Its Prevention. *Acta medica Indonesiana*. 2016 Jul 1;48(3):228-238.
 19. Gamat M, McNeel DG. Androgen deprivation and immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(12):T297-T310. doi:10.1530/ERC-17-0145
 20. Bilusic M, Madan RA, Gulley JL. Immunotherapy of Prostate Cancer: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res*. 2017;23(22):6764-6770. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-001921.
 - Sountoulides P, Rountos T. Adverse effects of androgen deprivation therapy for prostate cancer: prevention and management. *ISRN Urol*. 2013;2013:240108. Published 2013 Jul 25. doi:10.1155/2013/240108
 22. Yu H, Pan J, Guo Z, Yang C, Mao L. CART cell therapy for prostate cancer: status and promise. *Onco Targets Ther*. 2019;12:391-395. Published 2019 Jan 3. doi:10.2147/OTT.S185556
 23. Sha HH, Wang DD, Yan DL, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for tumour immunotherapy. *Biosci Rep*. 2017;37(1):BSR20160332. Published 2017 Jan 27. doi:10.1042/BSR20160332
 24. Rupp LJ, Schumann K, Roybal KT, et al. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):737. Published 2017 Apr 7. doi:10.1038/s41598-017-00462-8
 25. Chen H, Choi J, Bailey S. Cut site selection by the two nuclease domains of the Cas9 RNA-guided endonuclease. *J Biol Chem*. 2014;289(19):13284-13294. doi:10.1074/jbc.M113.539726
 26. Fay AP, Antonarakis ES. Blocking the PD-1/PD-L1 axis in advanced prostate cancer: are we moving in the right direction?. *Ann Transl Med*. 2019;7(Suppl 1):S7. doi:10.21037/atm.2019.01.37
 27. Wallis CJD, Nam RK. Prostate Cancer Genetics: A Review. *Ejifcc Int Fed Clin Chem Lab Med [Internet]*. 2015;26(2):79–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27683484><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4975354>.
 28. Ricke EA, Williams K, Lee YF, Couto S, Wang Y, Hayward SW, et al. Androgen Hormone Action in Prostatic Carcinogenesis: Stromal Androgen Receptors Mediate Prostate Cancer Progression, Malignant Transformation and Metastasis. *Carcinogenesis*. 2012;33(7):1391–8.
 29. Simoes GF, Sakuramoto P, Santos CB dos, Furlan NKC, Augusto TM. An Overview on Prostate Pathophysiology: New Insights into Prostate Cancer Clinical Diagnosis. In: *Pathophysiology-Altered Physiological States*. Brazil: IntechOpen; 2018. p. 183–202.
 30. Ragin C, Davis-Reyes B, Tadesse H, Daniels D, Bunker CH, Jackson M, et al. Farming, Reported Pesticide Use, and Prostate Cancer. *Am J Mens Health*. 2013;7(2):102–9.
 31. Stopsack KH, Mucci LA, Antonarakis ES, Nelson PS, Kantoff PW. TMPRSS2 and COVID-19: Serendipity or opportunity for intervention?

- Cancer Discov Am Assoc Cancer Res. 2020;10(1):1–4.
32. Baena E, Shao Z, Linn DE, Glass K, Hamblen MJ, Fujiwara Y, et al. ETV1 Directs Androgen Metabolism and Confers Aggressive Prostate Cancer in Targeted Mice and Patients. *Genes Dev.* 2013;27(6):683–98.
 33. Linn DE, Bronson RT, Li Z. Genetic Interaction Between Tmprss2-ERG Gene Fusion and Nkx3.1-loss does not Enhance Prostate Tumorigenesis in Mouse Models. *PLoS One.* 2015;10(3):1–12.
 34. St. John J, Powell K, Katie Conley-LaComb M, Chinni SR. TMPRSS2-ERG Fusion Gene Expression in Prostate Tumor Cells and Its Clinical and Biological Significance in Prostate Cancer Progression. *J Cancer Sci Ther.* 2012;4(4):94–101.
 35. Liu CY, Yu T, Huang Y, Cui L, Hong W. ETS (E26 transformation-specific) Up-regulation of the Transcriptional co-Activator TAZ Promotes Cell Migration and Metastasis in Prostate Cancer. *J Biol Chem.* 2017;292(22):9420–30.
 36. Mottet N, Bergh van den, Briers E, Cornford P, Grummet J, Santis, et al. EAU - EANM - ESTRO - ESUR - SIOG Guidelines on Prostate Cancer 2019 [Internet]. European Association of Urology Guidelines 2019. European Association of Urology; 2019. 1-161 p. Available from: <https://uroweb.org/guideline/prostate-cancer>
 37. Chen CY, Chen J, He L, Stiles BL. PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9(338):1–12.
 38. Rubin MA, Maher CA, Chinnaiyan AM. Common Gene Rearrangements in Prostate Cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(27):3659–68.
 39. Ness N, Andersen S, Khanekhenari MR, Nordbakken C V., Valkov A, Paulsen EE, et al. The Prognostic Role of Immune Checkpoint Markers Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) and Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) in a Large, Multicenter Prostate Cancer Cohort. *Oncotarget.* 2017;8(16):26789–801.
 40. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Emma J, Taylor M, et al. PD-1 Blockade Induces Responses by Inhibiting Adaptive Immune Resistance. *Nature.* 2015;515(7528):568–71.
 41. Fay AP, Antonarakis ES. Blocking the PD-1/PD-L1 Axis in Advanced Prostate Cancer. *Ann Transl Med.* 2019;7:1–4.
 42. Gevensleben H, Dietrich D, Golletz C, Steiner S, Jung M, Thiesler T, et al. The Immune Checkpoint Regulator PD-L1 is Highly Expressed in Aggressive Primary Prostate Cancer. *Clin Cancer Res.* 2016;22(8):1969–77.
 43. Sharma M, Yang Z, Miyamoto H, Lucarelli G. Immunohistochemistry of Immune Checkpoint Markers PD-1 and PD-L1 in Prostate Cancer. *Med (United States).* 2019;98(38):1–6.
 44. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1: PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol.* 2016;7(550):1–17.
 45. Yeku O, Slovin SF. Immune Therapy for Prostate Cancer. *Cancer J.* 2016;22(5):334-341. doi:10.1097/PPO.000000000000223
 46. Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov.* 2013;3(4):388-398. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0548
 47. Benmebarek MR, Karches CH, Cadilha BL, Lesch S, Endres S, Kobold S. Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6):1283. Published 2019 Mar 14. doi:10.3390/ijms20061283
 48. Magee MS, Snook AE. Challenges to chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy for cancer. *Discov Med.* 2014;18(100):265-271.
 49. Yu S, Li A, Liu Q, et al. Chimeric antigen receptor T cells: a novel therapy for solid tumors. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):78. Published 2017 Mar 29. doi:10.1186/s13045-017-0444-9

50. Westdorp H, Sköld AE, Snijer BA, et al. Immunotherapy for prostate cancer: lessons from responses to tumor-associated antigens. *Front Immunol.* 2014;5:191. Published 2014 May 6. doi:10.3389/fimmu.2014.00191
51. Junghans RP, Ma Q, Rathore R, et al. Phase I Trial of Anti-PSMA Designer CAR-T Cells in Prostate Cancer: Possible Role for Interacting Interleukin 2-T Cell Pharmacodynamics as a Determinant of Clinical Response. *Prostate.* 2016;76(14):1257-1270. doi:10.1002/pros.23214
52. Slovin SF, Wang X, Hullings M, Arauz G, Bartido S, Lewis JS, Schöder H, Zanzonico P, Scher HI, Sadelain M, et al. Chimeric antigen receptor (CAR+) modified T cells targeting prostate-specific membrane antigen (PSMA) in patients (pts) with castrate metastatic prostate cancer (CMPC). *J. Clin. Oncol.* 2013;31. doi:10.1200/jco.2013.31.6_suppl.72
53. Diao W, Cai H, Chen L, Jin X, Liao X, Jia Z. Recent Advances in Prostate-Specific Membrane Antigen-Based Radiopharmaceuticals. *Curr Top Med Chem.* 2019;19(1):33-56. doi:10.2174/1568026619666190201100739
54. Ullah K, Addai Peprah F, Yu F, Shi H. The application of prostate specific membrane antigen in CART-cell therapy for treatment of prostate carcinoma (Review). *Oncol Rep.* 2018;40(6):3136-3143. doi:10.3892/or.2018.6758
55. Schepisi, G., Cursano, M.C., Casadei, C. et al. CAR-T cell therapy: a potential new strategy against prostate cancer. *J. immunotherapy cancer* 7, 258 (2019). <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0741-7>
56. Hofman MS, Hicks RJ, Maurer T, Eiber M. Prostate-specific Membrane Antigen PET: Clinical Utility in Prostate Cancer, Normal Patterns, Pearls, and Pitfalls. *Radiographics.* 2018;38(1):200-217. doi:10.1148/rg.2018170108
57. Textor A, Listopad JJ, Wuhrmann LL, Perez C, Kruschinski A, Chmielewski M, et al. Efficacy of CAR T-cell therapy in large tumors relies upon stromal targeting by IFN γ . *Cancer Res.* 2014;74(23):6796–805
58. Zhang Q, Helfand BT, Carneiro BA, et al. Efficacy Against Human Prostate Cancer by Prostate-specific Membrane Antigen-specific, Transforming Growth Factor- β Insensitive Genetically Targeted CD8⁺ T-cells Derived from Patients with Metastatic Castrate-resistant Disease. *Eur Urol.* 2018;73(5):648-652. doi:10.1016/j.eururo.2017.12.008
59. Cong L, Zhang F. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. *Methods Mol Biol.* 2015;1239:197-217. doi:10.1007/978-1-4939-1862-1_10
60. Rodríguez-Rodríguez DR, Ramírez-Solís R, Garza-Elizondo MA, Garza-Rodríguez ML, Barrera-Saldaña HA. Genome editing: A perspective on the application of CRISPR/Cas9 to study human diseases (Review). *Int J Mol Med.* 2019;43(4):1559-1574. doi:10.3892/ijmm.2019.4112
61. Redman M, King A, Watson C, King D. What is CRISPR/Cas9?. *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2016;101(4):213-215. doi:10.1136/archdischild-2016-310459
62. Ryu SM, Hur JW, Kim K. Evolution of CRISPR towards accurate and efficient mammal genome engineering. *BMB Rep.* 2019;52(8):475-481. doi:10.5483/BMBRep.2019.52.8.149
63. Hu W, Zi Z, Jin Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances human mesothelin-targeted CAR T cell effector functions. *Cancer Immunol Immunother.* 2019;68(3):365-377. doi:10.1007/s00262-018-2281-2
64. Zhao Z, Shi L, Zhang W, et al. CRISPR knock out of programmed cell death protein 1 enhances anti-tumor activity of cytotoxic T lymphocytes. *Oncotarget.* 2017;9(4):5208-5215. Published

- 2017 Dec 27.
doi:10.18632/oncotarget.23730
65. Guo X, Jiang H, Shi B, et al. Disruption of PD-1 Enhanced the Anti-tumor Activity of Chimeric Antigen Receptor T Cells Against Hepatocellular Carcinoma. *Front Pharmacol.* 2018;9:1118. Published 2018 Oct 1. doi:10.3389/fphar.2018.01118