

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

EXPERIMENTAL STUDIES

Экспериментальное исследование функциональной активности химерного антигенного рецептора NKG2D *in vitro* и *in vivo*

К.А. Левчук¹, С.А. Осипова¹, А.В. Онопченко¹,
М.Л. Васютина¹, Э.Р. Булатов², А.Х. Валиуллина²,
О.Н. Демидов^{1,3,4}, А.В. Петухов¹

¹ ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Акkuratова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341

² ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», ул. Кремлевская, д. 18, Казань, Российская Федерация, 420008

³ ФГБУН «Институт цитологии РАН», Тихорецкий пр-т, д. 4, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194064

⁴ Научно-технологический университет «Сириус», Олимпийский пр-т, д. 1, Сочи, Российская Федерация, 354340

Experimental Study of the *In Vitro* and *In Vivo* Functional Activity of NKG2D Chimeric Antigen Receptor

KA Levchuk¹, SA Osipova¹, AV Onopchenko¹,
ML Vasyutina¹, ER Bulatov², AKh Valiullina²,
ON Demidov^{1,3,4}, AV Petukhov¹

¹ VA Almazov National Medical Research Center, 2 Akkuratova ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341

² Kazan (Privolzhsky) Federal University, 18 Kremlevskaya ul., Kazan, Russian Federation, 420008

³ Institute of Cytology, 4 Tikhoretskii pr-t, Saint Petersburg, Russian Federation, 194064

⁴ Sirius University of Science and Technology, 1 Olimpiiskii pr-t, Sochi, Russian Federation, 354340

РЕФЕРАТ

Цель. Исследование противоопухолевого цитотоксического эффекта NKG2D CAR Т-клеток и анти-CD19 CAR Т-клеток *in vitro* и *in vivo* с целью сравнить противоопухолевую активность химерных антигенных рецепторов (CAR) разного структурно-функционального состава.

Материалы и методы. Конструкции CAR были получены с помощью молекулярного клонирования; CAR Т-клеточные популяции — путем трансдукции Т-лимфоцитов здорового донора рекомбинантными лентивирусными частицами, несущими последовательность CAR NKG2D или CAR к антигену-мишени CD19. Долю CAR Т-клеток оценивали по флуоресценции белка FusionRed и по визуализации мембранного рецептора EGFR. Специфическую цитотоксическую активность эффекторных CAR Т-клеток анализировали *in vitro* с помощью теста цитотоксичности в реальном времени (RTCA) при сокультивировании с клетками-мишенями линии HeLa_CD19, используя систему xCELLigence. Анализ синтеза интерферона-γ (IFN-γ) *in vitro* и *in vivo* и наличия цитотоксического эффекта проводили, используя иммуноферментный анализ культуральной среды сокультивированных клеток-эффекторов и мишеней, а также выделенной аутоплазмы периферической крови мышей. Для оценки функциональной активности клеток *in vivo* субпопуляции CAR-T (10 млн клеток/мышь) вводили иммунодефицитным мышам линии NSG-SGM3 спустя 12 дней после инъекции клеток линии HeLa_CD19 и подтверждения приживления и роста опухоли. Опухоли удаляли после эвтаназии и фиксировали в парафине для подготовки гистологических срезов. Анализ CAR Т-клеточной ин-

ABSTRACT

Aim. To study antitumor cytotoxic effect of CAR-T NKG2D and CAR-T anti-CD19 *in vitro* and *in vivo* in order to compare antitumor activity of chimeric antigen receptors (CAR) with different structural and functional properties.

Materials & Methods. CAR constructions were produced by molecular cloning. CAR-T cell populations were obtained by transduction of healthy donor T-lymphocytes with recombinant lentiviral particles coding CAR NKG2D or CD19 target antigen CAR sequences. CAR-T cell proportion was assessed by FusionRed fluorescence and EGFR membrane receptor imaging. Specific *in vitro* cytotoxic activity of CAR-T effector cells was analyzed by Real-Time Cytotoxicity Assay (RTCA) during co-cultivation with HeLa_CD19 target cell line using xCELLigence. Interferon-γ (IFN-γ) synthesis *in vitro* and *in vivo* along with the degree of cytotoxic effect were analyzed by immunoassay of culture medium of co-cultivated effector cells and target cells as well as isolated auto-plasma from the peripheral blood of mice. To assess the *in vivo* functional activity, CAR-T cell populations were infused into immunodeficient NSG-SGM3 mice (10 000 000 cells/mouse) 12 days after HeLa_CD19 cell injection and confirmation of engraftment and tumor growth. Upon euthanasia, tumors were removed and fixed in paraffin to prepare histological sections. CAR-T cell tumor infiltration was assessed by CD3 antigen immunohistochemical staining.

Results. The highest ligand (molecules MICA, ULBP1/2/3/4/5/6) expression levels were detected in HeLa cell line. The obtained NKG2D CAR-T cells showed a considerable cytotoxic activity against HeLa_CD19 target line (cell index [CI] = 1.27), which was, however, twice as low as

филтрации опухолей осуществляли путем оценки иммуногистохимического окрашивания по антигену CD3.

Результаты. Наивысшие уровни экспрессии лигандов (молекул MICA, ULBP1/2/3/4/5/6) обнаружены в клеточной линии HeLa. Полученные NKG2D CAR Т-клетки характеризуются значительным цитотоксическим эффектом против линии-мишени HeLa_CD19 (клеточный индекс [КИ] = 1,27), но сниженным в 2 раза по сравнению с анти-CD19 CAR Т-клетками (КИ = 0,60) ($p = 0,0038$). Уровень IFN- γ при сокультивировании анти-CD19 CAR Т-клеток с HeLa_CD19 в соотношении E/T = 1:1 составил 64 852 пкг/мл, что в 3,5 раза больше уровня IFN- γ при сокультивировании NKG2D CAR Т-клеток с HeLa_CD19 (18 635 пкг/мл) ($p = 0,0360$). Степень инфильтрации опухоли анти-CD19 CAR Т-клетками была выше таковой у NKG2D CAR Т-клеток. Отсутствие пролиферирующих NKG2D CAR Т-клеток в периферической крови мышей подтверждает низкую их персистенцию. Концентрация IFN- γ в аутоплазме мышей из группы с введением анти-CD19 CAR Т-клеток составила 11,89 пкг/мл, а в группе с введением NKG2D CAR Т-клеток — 0,57 пкг/мл ($p = 0,0079$). Средняя масса опухолевых ксенографтов экспериментальных групп спустя 10 дней после введения анти-CD19 CAR Т-клеток составила 0,72 г ($p = 0,0142$), Т-лимфоцитов и NKG2D CAR Т-клеток — 2,12 и 1,2 г соответственно.

Заключение. Анти-CD19 CAR Т-клетки характеризуются более выраженным цитотоксическим эффектом в экспериментальных условиях как *in vitro*, так и *in vivo* по сравнению с NKG2D CAR Т-клетками. Степень пролиферации анти-CD19 CAR Т-клеток и их инфильтрации в мышинных ксенографтных моделях в значительной степени выше уровней, полученных в случае инъекции NKG2D CAR Т-клеток. Однократное введение NKG2D CAR Т-клеток способствует лишь кратковременному уменьшению опухоли.

Ключевые слова: CAR Т-клеточная терапия, химерный антигенный рецептор NKG2D, костимулирующие домены, лиганды NKG2D, цитотоксический эффект, инфильтрация CAR Т-клеток, персистенция CAR Т-клеток.

Получено: 27 июня 2022 г.

Принято в печать: 12 сентября 2022 г.

Для переписки: Ксения Александровна Левчук, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341; e-mail: levchuk_ka@almazovcentre.ru

Для цитирования: Левчук К.А., Осипова С.А., Онопченко А.В. и др. Экспериментальное исследование функциональной активности химерного антигенного рецептора NKG2D *in vitro* и *in vivo*. Клиническая онкогематология. 2022;15(4):327–39.

DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-4-327-339

that of CAR-T anti-CD19 (CI = 0.60) ($p = 0.0038$). IFN- γ level during co-cultivation of CAR-T anti-CD19 with HeLa_CD19 at the ratio of E/T = 1:1 was 64,852 pcg/mL, which was 3.5 times higher than IFN- γ level during co-cultivation of CAR-T NKG2D with HeLa_CD19 (18,635 pcg/mL) ($p = 0.0360$). The degree of tumor infiltration by CAR-T anti-CD19 cells was higher than that by CAR-T NKG2D. The absence of NKG2D proliferating CAR-T cells in mice peripheral blood confirms their low persistence. IFN- γ concentration in mice auto-plasma was 11.89 pcg/mL after CAR-T anti-CD19 infusion and 0.57 pcg/mL after CAR-T NKG2D infusion ($p = 0.0079$). The mean weight of tumor xenografts in experimental groups 10 days after CAR-T anti-CD19 injection was 0.72 g ($p = 0.0142$), after T-lymphocyte and NKG2D CAR-T cell infusions it was 2.12 g and 1.2 g, respectively.

Conclusion. CAR-T anti-CD19 cells are characterized by more pronounced cytotoxic effect under both *in vitro* and *in vivo* experimental conditions compared with CAR-T NKG2D cells. The degree of CAR-T anti-CD19 proliferation and their infiltration in mice xenograft models is considerably higher than the levels reached with NKG2D CAR-T cell injections. A single CAR-T NKG2D injection results only in short-term tumor reduction.

Keywords: CAR-T cell therapy, NKG2D chimeric antigen receptor, co-stimulatory domains, NKG2D ligands, cytotoxic effect, CAR-T infiltration, CAR-T persistence.

Received: June 27, 2022

Accepted: September 12, 2022

For correspondence: Kseniya Aleksandrovna Levchuk, 2 Akkuratova ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341; e-mail: levchuk_ka@almazovcentre.ru

For citation: Levchuk KA, Osipova SA, Onopchenko AV, et al. Experimental Study of the In Vitro and In Vivo Functional Activity of NKG2D Chimeric Antigen Receptor. Clinical oncohematology. 2022;15(4):327–39. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-4-327-339

ВВЕДЕНИЕ

Естественные клетки-киллеры (НК-клетки), будучи важным элементом иммунной системы, осуществляют цитотоксические функции в рамках событий врожденного и приобретенного иммунитета. Благо-

даря активационным и ингибирующим рецепторам на поверхности цитоплазматической мембраны НК-клетки также принимают участие в обеспечении противоопухолевого надзора. В нормальных условиях в НК-клетках превалирует ингибирующий сигнал, который при патологии может прерваться активацией и последующей цитотоксической активностью против

опухолевых клеток. Клеточный рецептор NKG2D, кодируемый геном *Klrk1*, — это активационный рецептор. Он представлен на NK-клетках, NKT-клетках, Т-лимфоцитах CD8+, Т-клетках gd. В норме Т-лимфоциты CD4+ человека не экспрессируют NKG2D даже после активации. Однако индукция его экспрессии напрямую зависит от патологических изменений, таких как болезнь Крона и цитомегаловирусная инфекция [1–3]. Основные функции передачи сигнала через рецептор NKG2D заключены в цитотоксическом эффекте и элиминации потенциально трансформированных клеток [4, 5]. У человека рецептор NKG2D экспрессируется только в виде изоформы NKG2D-L [6]. Передача сигнала осуществляется только через вспомогательный белок DAP10, запускающий внутриклеточный сигнальный каскад, связывая белок p85 PI3-киназы [7].

Рецептор NKG2D человека распознает 8 молекул-лигандов: MICA/B и UL16-связывающие белки 1–6 (ULBP1–6), известные как ранние транскрипты ретиноевой кислоты. Лиганды рецептора NKG2D структурно сходны с молекулами главного комплекса гистосовместимости I класса (MHC-I), включая домены a1, a2, a3 (иммуноглобулиноподобный домен) в составе лигандов MICA/B, a1 и a2 в составе лигандов ULBP. Увеличение уровня экспрессии лигандов рецептора NKG2D напрямую коррелирует с влиянием факторов клеточного стресса. В отсутствие влияния патологических факторов уровень экспрессии для всех лигандов одинаково низок ввиду превалирования ингибиторных сигналов и, наоборот, может быть индуцирован при клеточном стрессе, инфекции, онкогенной трансформации [8]. Высокий полиморфизм лигандов рецептора NKG2D влияет на патогенез острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). В работе Q.Z. Luo и соавт. показано, что у гомозиготных пациентов с микросателлитными аллелями A5 и аллелем *MICA*010* существует риск развития ОМЛ (соотношение частоты — 35,9 % у пациентов с ОМЛ и 17,6 % в контрольных группах) [9].

В исследованиях патогенеза COVID-19 установлено связывание белков *sov1* и *sov2* с рецептором NKG2D, которое увеличивает цитотоксическую активность NK-клеток посредством фосфорилирования *Vav1*, а также инициирует синтез интерферона- γ (IFN- γ). Так, модуляция связывания вирусных белков с рецептором NKG2D может служить потенциальным лечебным подходом [10]. Более того, активация NK-клеток и повышение уровня растворимого белка MICA, согласно исследованиям, относятся к прогностическим маркерам тяжести опухолевого заболевания [11]. В настоящее время также проводится клиническое исследование NCT04324996, в котором субпопуляция NKG2D-ACE2 CAR NK-клеток полностью ингибирует инфицирование вирусом SARS-CoV-2 эпителия легочных альвеол и предотвращает репликацию вирусных частиц.

Среди уникальных функций рецептора NKG2D также роль модулятора чувствительности и активации рецептора Т-клеток. После активации лиганда MICA Т-лимфоциты CD8+ продуцируют высокий уровень IFN- γ , фактора некроза опухолей- α (TNF- α), интерлейкина-2 (IL-2) в ответ на стимуляцию Т-кле-

точного рецептора (TCR) [12]. Однако для инициации созревания наивных Т-лимфоцитов CD8+ эффект рецептора NKG2D в качестве костимулирующей молекулы оказался недостаточным. В эксперименте по стимуляции *in vitro* человеческих Т-клеток CD8+ периферической крови было показано, что опосредованная дополнительная костимуляция с помощью молекулы CD28 обязательна для стимуляции рецептором NKG2D синтеза цитокинов и цитотоксической активности клеток после активации TCR [13]. Помимо костимулирующих функций рецептор NKG2D оказывает влияние на восприятие Т-клетками хемокинового сигнала. В основе такой регуляции лежит взаимодействие DAP10 и PI3К-киназы, что, таким образом, подразумевает изменение миграционного поведения Т-клеток [14].

Впервые результаты CAR Т-терапии NKG2D были представлены в 2005 г., они продемонстрировали эффективность NKG2D CAR Т-клеток против новообразований человека в мышиных моделях [15, 16]. Строение химерного антигенного рецептора (CAR) NKG2D может иметь несколько различных вариантов (рис. 1).

Полноразмерная последовательность рецептора NKG2D использована в первых двух конструкциях и связана с адаптерным белком DAP10. В отличие от других молекул, содержащих scFv, TCR или слитые белки, данные варианты дизайна рекомбинантных NKG2D не содержат упомянутых выше элементов, которые могли бы быть распознаны иммунной системой организма. Поскольку рецептор NKG2D является белком II типа, цитоплазматический участок домена CD3 ζ присоединен в обратной ориентации. Эффекторные клетки, экспрессирующие DAP10-ассоциированные молекулы CAR NKG2D, способны к продукции IFN- γ , гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и TNF- α , а также минимальные количества IL-5, IL-9, IL-10 [21, 22].

Две другие конструкции химерного антигенного рецептора NKG2D содержат костимулирующие домены CD28 и 4-1BB. В данном случае рецептор NKG2D — единственный белок II типа, в то время как остальные белки конструкции принадлежат к I типу, поэтому лиганд-связывающая часть рецептора NKG2D (aa 81/82–216) присоединена к трансмембранной части конструкции в обратной ориентации, которая одновременно поддерживает функцию связывания лиганда и экспрессию в виде белка I типа [18]. Эффекторные CAR Т-клетки, экспрессирующие данные конструкции химерных рецепторов на поверхности цитоплазматической мембраны, обладают высокой цитотоксической активностью, присущей клеткам и CD4+, и CD8+. Анти-CD19 CAR Т-клеточные субпопуляции, содержащие в структуре CD28 или 4-1BB костимулирующие домены, способны к высокому уровню клеточной экспансии *in vivo*. Сходную параллель можно провести для рецепторов NKG2D, содержащих костимулирующие домены. В то же время исследования активности DAP10-ассоциированных NKG2D CAR Т-клеток *in vivo* на мышиных моделях продемонстрировали их низкую жизнеспособность [23].

В рамках настоящей работы мы сравниваем эффективность двух химерных антигенных рецепторов:

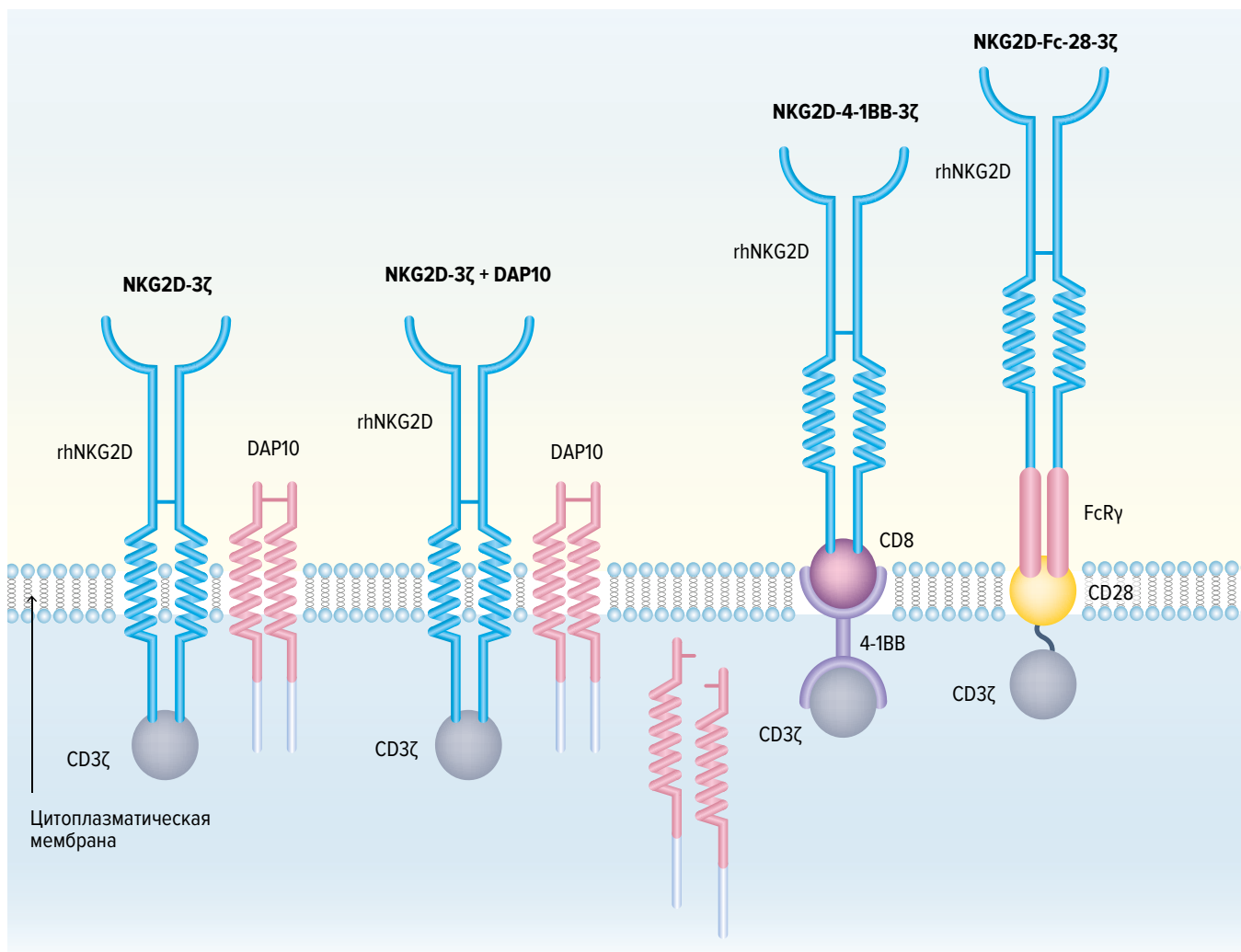


Рис. 1. Структурные варианты молекулярного дизайна активационного рецептора NKG2D: NKG2D-3 ζ [15, 16], NKG2D-3 ζ + DAP10 [17], NKG2D-4-1BB-3 ζ [18], NKG2D-Fc-28-3 ζ [19] (цит. по [20] с изменениями)

Fig. 1. Structural variants of molecular design of NKG2D activation receptor: NKG2D-3 ζ [15, 16], NKG2D-3 ζ + DAP10 [17], NKG2D-4-1BB-3 ζ [18], NKG2D-Fc-28-3 ζ [19] (modified from [20])

анти-CD19 CAR (FMC63-28 ζ) и NKG2D CAR-tEGFR — по функциональному характеру элиминации клеточной линии-мишени HeLa, экспрессирующей одновременно антиген CD19 и лиганды рецептора NKG2D. В ходе экспериментального этапа работы использовались конструкции следующих химерных антигенных рецепторов разного функционального состава (рис. 2). Так, исследуемые молекулы CAR имеют разную структурно-функциональную организацию. Главным отличием используемых конструкций служит наличие в случае рецептора антигена CD19 дополнительного костимулирующего домена — трансмембранного участка CD28, целиком входящего в состав молекулы, в то время как в конструкции рецептора NKG2D функция активации всего рецептора осуществляется посредством белка DAP10, отдельно кодируемого в конструкции через саморасщепляющиеся пептиды T2A и P2A. Трансмембранная часть домена CD3 ζ входит в структуру каждого из исследуемых рецепторов, а единственным отличием служит его обратная ориентация в структуре рецептора NKG2D. С помощью репортерного белка FusionRed возможна визуализация экспрессии молекулы анти-CD19 CAR в Т-лимфоцитах.

В конструкции исследуемого химерного антигенного рецептора NKG2D присутствует усеченная часть рецептора эпидермального фактора роста (EGFR; часть внеклеточного домена, трансмембранный домен и небольшой участок цитоплазматического), что представляет собой молекулярную «кассету» для самоэлиминации клеток. Данная конструкция предполагает возможность избежать избыточной персистенции в организме CAR Т-клеток с помощью добавления моноклональных антител к EGFR.

Таким образом, в настоящей работе сравнивается функциональное воздействие клеток-эффекторов CAR-T, несущих химерные антигенные рецепторы с разным вариантом конструкции, оказываемое на клеточную линию-мишень в экспериментальных условиях *in vitro* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеточных линий

Клеточные линии HEK293T и HeLa_CD19 культивировали в ростовой среде DMEM, содержащей

глутамин («ПанЭко», Россия), с 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Клеточные линии любезно предоставлены лабораторией регуляции экспрессии генов Института цитологии РАН.

Субпопуляции первичных Т-лимфоцитов человека получены из мононуклеарной фракции периферической крови здорового донора (после подписания добровольного информированного согласия) с помощью градиентного центрифугирования в Ficoll-Raque плотностью 1,078 г/мл (GE Healthcare, США). Фракцию Т-лимфоцитов сортировали и активировали из мононуклеарной фракции с помощью положительного магнитного сортирования частицами Dynabeads Human T-activator CD3/CD28 (Invitrogen, США) в соотношении 2:1 (магнитные частицы/клетки). После сортирования и активации Т-лимфоциты культивировали в питательной среде RPMI 1640 (Thermofisher, США) с добавлением 10 % FBS (HyClone, США), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 1000 ЕД/мл рекомбинантного человеческого IL-2 («Биотех», Россия). Экспансию Т-лимфоцитов осуществляли в течение 3 дней после активации, затем клетки трансдуцировали препаратом рекомбинантных лентивирусных частиц, несущих последовательность химерного антигенного рецептора антигена CD19 или NKG2D.

Производство рекомбинантных лентивирусных векторов, несущих нуклеотидные последовательности CAR

Для создания лентивирусных векторов, несущих гены CAR-anti-CD19, CAR-NKG2D (для трансдукции Т-клеток), использовали котрансфекцию плазмид системы лентивирусной сборки в линии-производителе HEK293T. Для трансдукции использовали лентивирусные частицы, псевдотипированные оболочечным белком G вируса везикулярного стоматита (VSV-G). Такое псевдотипирование обеспечивает широкий тропизм лентивирусных частиц ввиду экспрессии рецептора VSV-G на большинстве клеток человека. Клетки линии HEK293T рассевали на 150-мм культуральные чашки Петри (TPP, Швейцария) в количестве 5×10^6 на чашку. На следующий день, по достижении конfluence, равной 50–70 %, приступали к этапу транзиторной трансфекции. В стерильном фальконе в необходимом объеме среды Opti-MEM (Gibco, США) смешивали 3 плазмиды: 30 мкг PsPax2 (Addgene plasmid #12260), 30 мкг pCAR anti-CD19/pCAR NKG2D, 10 мкг pMD2G (Addgene plasmid #12259). После перемешивания добавляли трансфецирующий агент PEI MAX (1 мг/мл) (Sigma-Aldrich, США) в соотношении pDNA/PEI 3:1. Полученную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин, после чего добавляли линии HEK293T. Через 5–6 ч проводили смену среды на бессывороточную Opti-MEM, содержащую 5 ммоль натрия бутирата. Спустя 72 ч осуществляли сбор супернатанта, центрифугировали со скоростью 2000 g в течение 5–7 мин для осаждения клеток и переносили осветленный супернатант. Собранный супернатант фильтровали с помощью стериль-

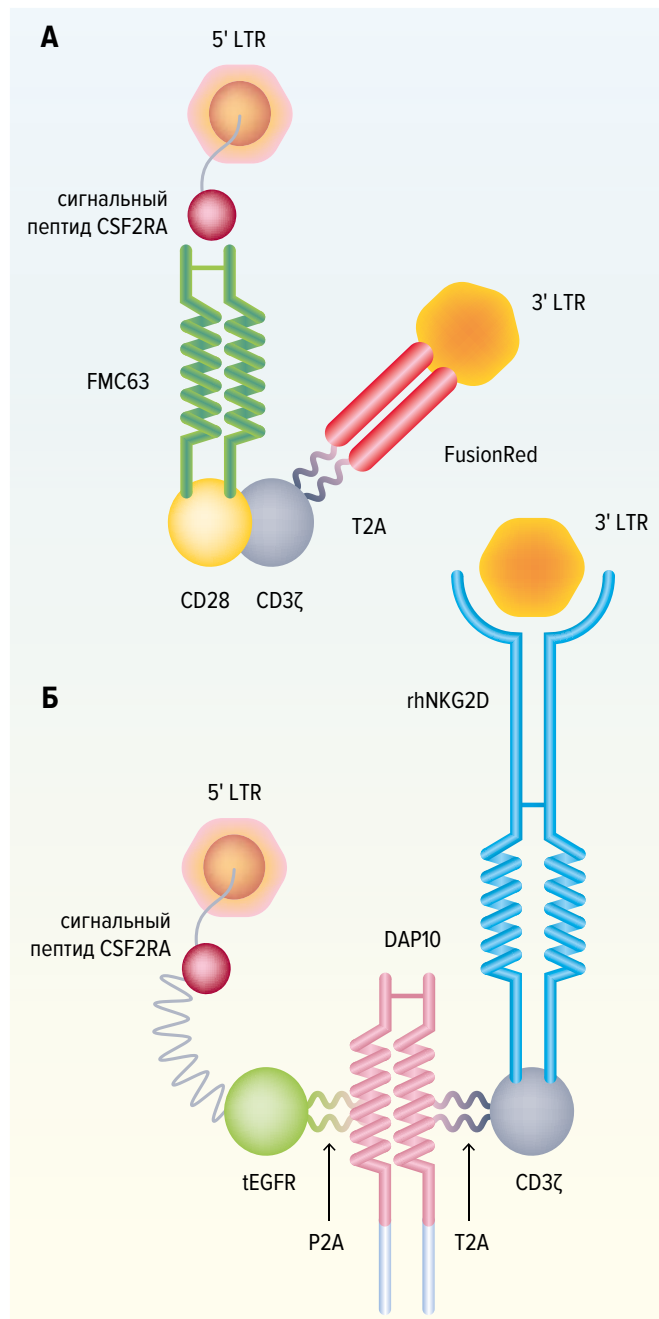


Рис. 2. Схематическое изображение последовательностей исследуемых химерных антигенных рецепторов (А) анти-CD19 и (Б) NKG2D

CSF2RA — субъединица рецептора гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора; LTR — длинный концевой повтор; P2A, T2A — саморасщепляющиеся пептиды; tEGFR — усеченный рецептор эпидермального фактора роста.

Fig. 2. Diagram of chimeric antigen receptor sequences (A) anti-CD19 and (B) NKG2D

CSF2RA — subunit of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor; LTR — long terminal repeat; P2A, T2A — self-cleaving peptides; tEGFR — truncated epidermal growth factor receptor.

ного мембранного фильтра полиэфирсульфона с диаметром пор 0,45 мкм (Millipore, США). Рекомбинантные лентивирусные частицы концентрировали с помощью центрифужных модулей Amicon Ultra-15 100 кДа (Millipore, США) со скоростью 3000 g в течение 30 мин. Готовые лентивирусные препараты использовали для клеточной трансдукции и получения модифицированных линий.

Плазмидные векторы, кодирующие последовательность CAR

Для сборки лентивирусных частиц анти-CD19 CAR Т-клеток был получен плазмидный вектор, кодирующий последовательность CAR к антигену-мишени CD19. Клонирование плазмидного вектора осуществляли в ЗАО «Евроген». Для создания CAR Т-клеточной субпопуляции, несущей химерный антигенный рецептор NKG2D, был получен вектор NKG2D_tEGFR. Синтез генетической конструкции *de novo* осуществляли в ЗАО «Евроген».

Трансдукция клеточных линий препаратом рекомбинантного лентивируса

Трансдукцию для получения CAR Т-клеток осуществляли спустя 72 ч экспансии активированных лимфоцитов. Для этого к клеткам добавляли очищенный и сконцентрированный вирус с 50 MOI (множественность заражения), а также 50 мкг/мл протамина сульфата. Через 6 ч трансдукционную смесь разбавляли раствором полной питательной среды RPMI-1640. Спустя 72 ч после этапа трансдукции проводили цитофлюориметрический анализ экспрессии трансгена.

Имуноферментный анализ экспрессии цитокинов

Исследование синтеза IFN- γ при сокультивировании мишеней и эффекторов осуществляли с помощью наборов реагентов для иммуноферментного определения концентрации «Альфа-Интерферон-ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест», Россия). Анализ осуществляли согласно протоколу производителя.

Проточная цитометрия

С помощью проточной цитометрии оценивали эффективность трансдукции Т-лимфоцитов и получение субпопуляций анти-CD19 CAR Т-клеток и NKG2D CAR Т-клеток. Персистенцию CAR Т-клеток определяли по фенотипированию Т-лимфоцитов, выделенных из образцов периферической крови мышей после эвтаназии. Фракцию эритроцитов предварительно лизировали раствором VersaLyse (Beckman Coulter, США). Т-лимфоциты фенотипировали антителами CD3 FITC, CD4 APC, CD8 APC-Cy7 (BD, США).

Количественная ПЦР в реальном времени

Для анализа уровней экспрессии лигандов рецептора NKG2D получали фракцию тотальной мРНК клеток следующих линий: HeLa, K-562, NB-4. Выделение мРНК осуществляли набором RNeasy Micro Kit (Qiagen, США) согласно протоколу производителя. На матрице мРНК синтезировали цепь кДНК с помощью реакции обратной транскрипции, используя набор MMLV kit («Евроген», Россия). Для проведения реакции обратной транскрипции отбирали по 2 мкг мРНК каждого экспериментального образца. Оценку уровня экспрессии генов лигандов рецептора NKG2D, мишеней MICA/B, ULBP1–6 проводили с помощью набора qPCRMix-HS SYBR («Евроген», Россия). Определение флуоресценции амплификатов осуществляли с помощью амплификатора Real-time CFX96 Touch (BioRad, США). Специфичность продуктов ПЦР-ре-

акции верифицировали по стадии кривой плавления, анализ ddCq и графическое представление данных проводили в ПО CFX Manager (BioRad, США).

Оценка цитотоксической активности CAR Т-лимфоцитов *in vitro* в реальном времени

Цитотоксическую активность полученных CAR Т-клеток оценивали в реальном времени при сокультивировании с линией HeLa_CD19 с помощью инструмента RTCA xCELLigence (ACEA Biosciences, США). Оценку цитотоксического эффекта CAR Т-клеток осуществляли в течение 72 ч сокультивирования при соотношении эффекторов/опухоли (Е/Т) 1:1. Эффекторные CAR Т-клетки рассевали спустя 24 ч культивирования клеток-мишеней. Цитотоксическую активность оценивали по изменению значений клеточного индекса (КИ).

Мышиные модели

В данной работе проводили экспериментальное введение анти-CD19 CAR Т-клеток и NKG2D CAR Т-клеток *in vivo*, используя линию иммунодефицитных тройных трансгенных мышей NSG-SGM3. Возраст мышей составлял 2,5–3 мес., в эксперименте участвовали самцы и самки. Это мыши с глубоким комплексным иммунодефицитом, содержащие следующие трансгены:

- S — Human Stem Cell Factor (SCF) ген, также известный как KIT ligand (KITLG), влияет на гемопоэтические стволовые клетки с увеличением их вовлечения в клеточный цикл, что необходимо для обеспечения нормального базального гемопоэза;
- GM — Human Granulocyte/Macrophage-colony stimulating factor 2 (GM-CSF), также известный как CSF2, повышает число и активность нейтрофилов, эозинофилов и макрофагов;
- 3 — Human interleukin-3 (IL-3) стимулирует мультипотентные гемопоэтические стволовые клетки к дифференцировке в миелоидные клетки-предшественницы. Кроме того, он стимулирует все клетки миелоидного ряда (гранулоциты, моноциты и дендритные клетки) к пролиферации в сочетании с другими цитокинами.

Использование животных данной линии позволяет трансплантировать клетки и ткани человека без реакции отторжения трансплантата.

Мышам осуществляли инъекцию клеток опухоли HeLa_CD19. После пальпирования опухолей в экспериментальных группах спустя 12 дней вводили CAR Т-клетки в количестве 10 млн/мышь в объеме буферного раствора 0,2 мл. Животные группы № 1 (5 особей) получили анти-CD19 CAR Т-клетки в 0,2 мл физиологического раствора; животные группы № 2 (5 особей) — NKG2D CAR Т-клетки в 0,2 мл физиологического раствора; животные группы № 3 (5 особей) — Т-лимфоциты в 0,2 мл физиологического раствора. Длительность экспериментального наблюдения составила 10 дней. Для эвтаназии экспериментальных животных применяли метод наркотизации фораном. Опухоли были препарированы, взвешены и измерены.

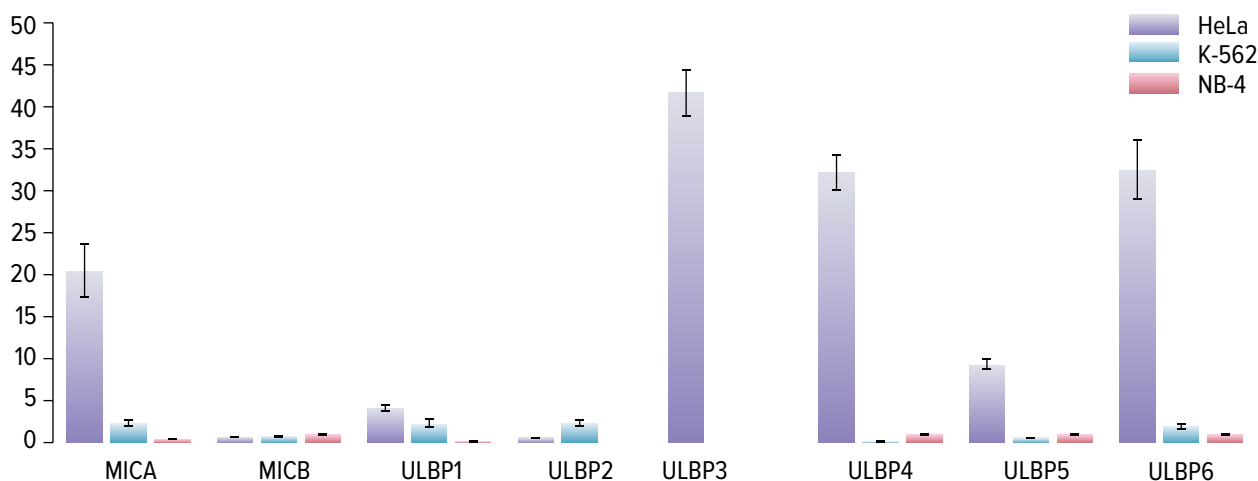


Рис. 3. Анализ уровня экспрессии лигандов рецептора NKG2D в клеточных линиях HeLa, K-562, NB-4. Уровень экспрессии лигандов MICA/B, ULBP1–6 в линии HeLa выше, чем в других исследуемых линиях

Fig. 3. Ligand expression levels of NKG2D receptor in HeLa, K-562, and NB-4 cell lines. Ligand expression level of MICA/B and ULBP1–6 in HeLa line is higher than in other lines under investigation

Иммуногистохимическое исследование препаратов солидных опухолей мышей

После эвтаназии мышей опухоли извлекали для фиксации и подготовки образцов к парафинированию. Ткани фиксировали в 10% буферном растворе формалина в течение 24 ч. Обезвоживание и пропитывание парафином проводили по стандартизованной методике в автоматическом гистопроцессоре замкнутого типа Tissue-Tek® VIP™ 5 Jg по адаптированному протоколу (Sakura, Япония) в готовом растворе IsoPREP («Биовитрум», Россия) и парафиновой среде HISTOMIX («Биовитрум», Россия). С использованием ротационного микротомы HM 325 (Thermo, США) изготавливали срезы толщиной 2–3 мкм, которые в дальнейшем депарафинировали, дегидратировали, окрашивали гистологическими методами по общепринятой стандартизованной методике гематоксилином и эозином в соответствии с рекомендациями производителя («Биовитрум», Россия).

Иммуногистохимические реакции проводили по стандартной методике, основываясь на рекомендациях компании — производителя первичных антител. Срезы помещали на стекло с полилизинным покрытием (ThermoFisher, США), высушивали в термостате в течение 18 ч при температуре 37 °С, депарафинировали, дегидратировали и проводили демаскировку антигенов в буфере pH 9,0 в модуле PT-Link (Dako, Дания) при температуре 97 °С в течение 20 мин. Эндogenous пероксидазную активность блокировали инкубацией в течение 10 мин в растворе, блокирующем пероксидазу (EnVision, Dako, Дания). Инкубацию с первичными антителами (CD19, CD4, CD8, CD3) проводили в условиях влажной камеры в течение 30 мин при комнатной температуре. Для визуализации продукта реакции использовали полимерную систему EnVision (Dako, Дания) с диаминобензидином (DAB). Инкубацию с раствором HRP осуществляли в условиях влажной камеры в течение 30 мин при комнатной температуре, визуализацию с DAB — в течение 5–10 мин при комнатной температуре. Препараты докрасивали гематоксилином Майера, дегидратиро-

вали в спирте, просветляли в ксилоле и заключали в «Витрогель» («Биовитрум», Россия).

В работе использовались следующие антитела:

- CD19, LE-CD19, Unconjugated, FLEX RTU, IR656 DAKO/Agilent;
- CD8 Lab Vision CD8, Rabbit Monoclonal Antibody RM-9116-RQ Thermo Fisher Scientific;
- CD4 Lab Vision CD4 Ab-8, Mouse Monoclonal Antibody MS-1528-RQ Thermo Fisher Scientific;
- CD3 Lab Vision CD3 (Early T-Cell Marker), Rabbit Monoclonal Antibody RM-9107-RQ Thermo Fisher Scientific.

Гистологические препараты изучали с помощью микроскопа Nikon ECLIPSE Ni-U (Япония) с окуляром x10 и объективами x10, x20, x40. Фотографирование и морфометрия выполнялись с использованием цифровой фотокамеры Nikon DSFi2 и программы анализа цифровых изображений NIS-Elements BR (V.4.40) (Япония). Анализ гистологических препаратов проводился в 10 полях зрения при увеличении в 40 раз для каждого образца. Экспрессию маркеров определяли как процент клеток, имеющих специфическое окрашивание.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выбор релевантной модельной линии-мишени для оценки функциональности NKG2D CAR Т-клеток

Для выбора релевантной клеточной модели с целью проверки цитотоксической активности полученных NKG2D CAR Т-клеток оценивали уровень экспрессии лигандов MICA/B, ULBP1–6 в клеточных линиях HeLa, K-562, NB-4 без индукции дополнительными стресс-факторами (рис. 3).

Наивысшие уровни экспрессии лигандов MICA, ULBP1–6 обнаружены в линии HeLa, следовательно, сокультивирование клеток-эффекторов CAR-T NKG2D с этой линией позволит адекватно оценить специфичность цитотоксического эффекта исследуемой субпопуляции CAR Т-лимфоцитов.

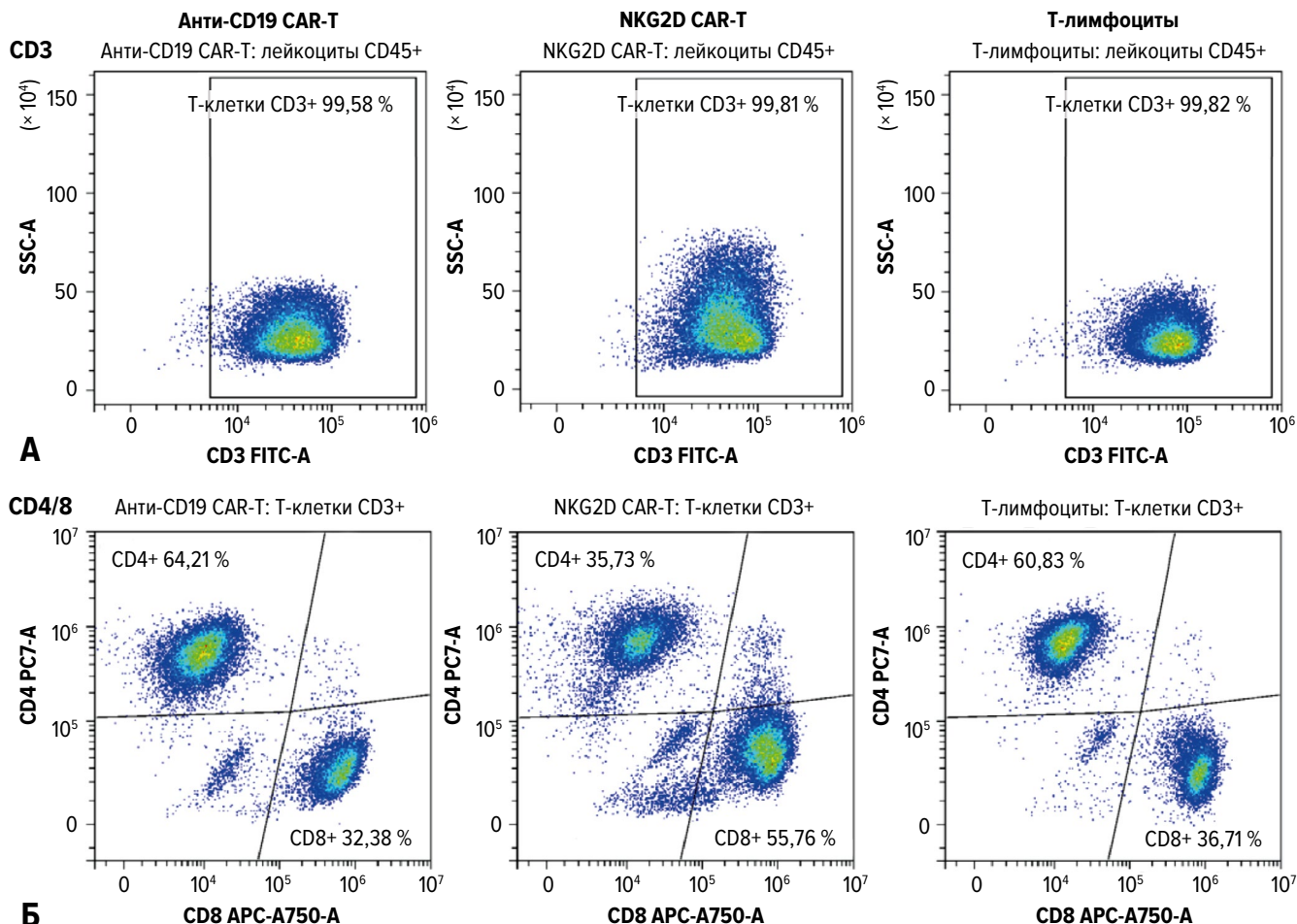


Рис. 4. Цитофлюориметрический анализ анти-CD19 CAR Т-клеток, NKG2D CAR Т-клеток и Т-лимфоцитов по различным маркерам: А — окрашивание по антигену CD3; Б — окрашивание по антигенам CD4 и CD8

Fig. 4. Cytofluorimetric analysis of CAR-T anti-CD19, CAR-T NKG2D, and T-lymphocytes with respect to various markers: А — antigen CD3 staining; Б — CD4 and CD8 antigen staining

Оценка фенотипа эффекторных CAR

Т-лимфоцитов

Экспериментальные анти-CD19 CAR Т-клетки, NKG2D CAR Т-клетки и Т-лимфоциты фенотипировали по маркерам CD4, CD8. Они имели минимальные различия по субпопуляционному составу CD4/CD8 (рис. 4).

Соотношение CD4/CD8 для анти-CD19 CAR Т-клеток составляло 2:1, для NKG2D CAR Т-клеток — 1:1,5, для Т-лимфоцитов — 1,6:1. Таким образом, NKG2D CAR Т-клетки имели смещение субпопуляционного состава в сторону цитотоксического фенотипа Т-киллеров, в то время как у анти-CD19 CAR Т-клеток и контрольной группы Т-лимфоцитов наблюдается сдвиг в сторону фенотипа Т-хелперов CD4⁺.

Анализ цитотоксической активности NKG2D CAR

Т-клеток

Цитотоксическую активность полученных CAR Т-клеток оценивали в реальном времени при сокультивировании с линией HeLa_CD19 с помощью инструмента RTCA xCELLigence (ACEA Biosciences, США). Оценку цитотоксического эффекта CAR Т-клеток проводили в течение 72 ч сокультивирования при соотношении Е/Т, равном 1:1 (рис. 5). Эффекторные CAR Т-клетки рассевали спустя 24 ч культивирования клеток-мишеней.

Согласно полученным результатам и снижению КИ, субпопуляция NKG2D CAR Т-клеток характери-

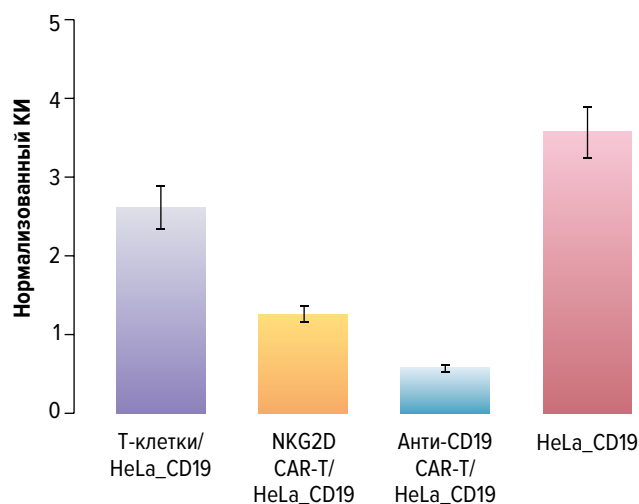


Рис. 5. Анализ специфической цитотоксической активности в реальном времени NKG2D CAR Т-клеток и анти-CD19 CAR Т-клеток при сокультивировании с клеточной линией HeLa_CD19. Гистограмма значений нормализованного клеточного индекса (КИ) в точке 48 ч (спустя 24 ч коинкубации мишеней и эффекторов). Соотношение Е/Т равно 1:1 ($p = 0,0038$, тест Краскела—Уоллиса)

Fig. 5. Real-Time Cytotoxicity Assay of CAR-T NKG2D and CAR-T anti-CD19 during their co-cultivation with HeLa_CD19 cell line. Histogram of normalized cell index (KI) at the time-point of 48 hours (24 hours after target and effector co-incubation). The E/T ratio is 1:1 ($p = 0.0038$, Kruskal-Wallis test)

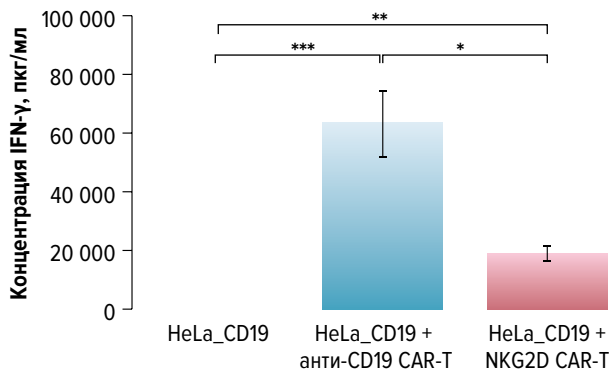


Рис. 6. Содержание интерферона-γ (IFN-γ) при *in vitro* сокультивировании анти-CD19 CAR T-клеток и NKG2D CAR T-клеток с линией-мишенью HeLa_CD19. Соотношение E/T равно 1:1
 * $p = 0,0360$ (тест Манна—Уитни); ** $p = 0,0006$ (HeLa_CD19/HeLa_CD19 + NKG2D CAR-T); *** $p = 0,0002$ (HeLa_CD19/HeLa_CD19 + анти-CD19 CAR-T).

Fig. 6. Interferon-γ (IFN-γ) concentration during *in vitro* co-cultivation of CAR-T anti-CD19 and CAR-T NKG2D with HeLa_CD19 tumor cell line. The E/T ratio is 1:1
 * $p = 0.0360$ (Mann-Whitney test); ** $p = 0.0006$ (HeLa_CD19/HeLa_CD19 + CAR-T NKG2D); *** $p = 0.0002$ (HeLa_CD19/HeLa_CD19 + CAR-T anti-CD19).

зуется значительным цитотоксическим эффектом против линии-мишени HeLa_CD19 (КИ = 1,27), но сниженным в 2 раза по сравнению с анти-CD19 CAR T-клетками (КИ = 0,60). Наибольшая цитотоксическая активность против исследуемых мишеней наблюдается при сокультивировании анти-CD19 CAR T-клеток с линией HeLa_CD19.

Для оценки функциональности исследуемых популяций CAR T-клеток изучали уровень синтеза цитокина IFN-γ при сокультивировании с линией-мишенью HeLa_CD19 (рис. 6).

Уровень IFN-γ при сокультивировании анти-CD19 CAR T-клеток с HeLa_CD19 составил 64 852 пкг/мл, что в 3,5 раза больше уровня IFN-γ при сокультивировании NKG2D CAR T-клеток с HeLa_CD19 (18 635 пкг/мл).

Оценка степени инфильтрации CAR T-лимфоцитов в опухоли HeLa_CD19 *in vivo*

Согласно результатам иммуногистохимического окрашивания парафиновых срезов опухолей мышей линии NSG-SGM3 по маркерам CD3, CD4 и CD8, степень инфильтрации анти-CD19 CAR T-клеток оказалась выше таковой у NKG2D CAR T-клеток (рис. 7).

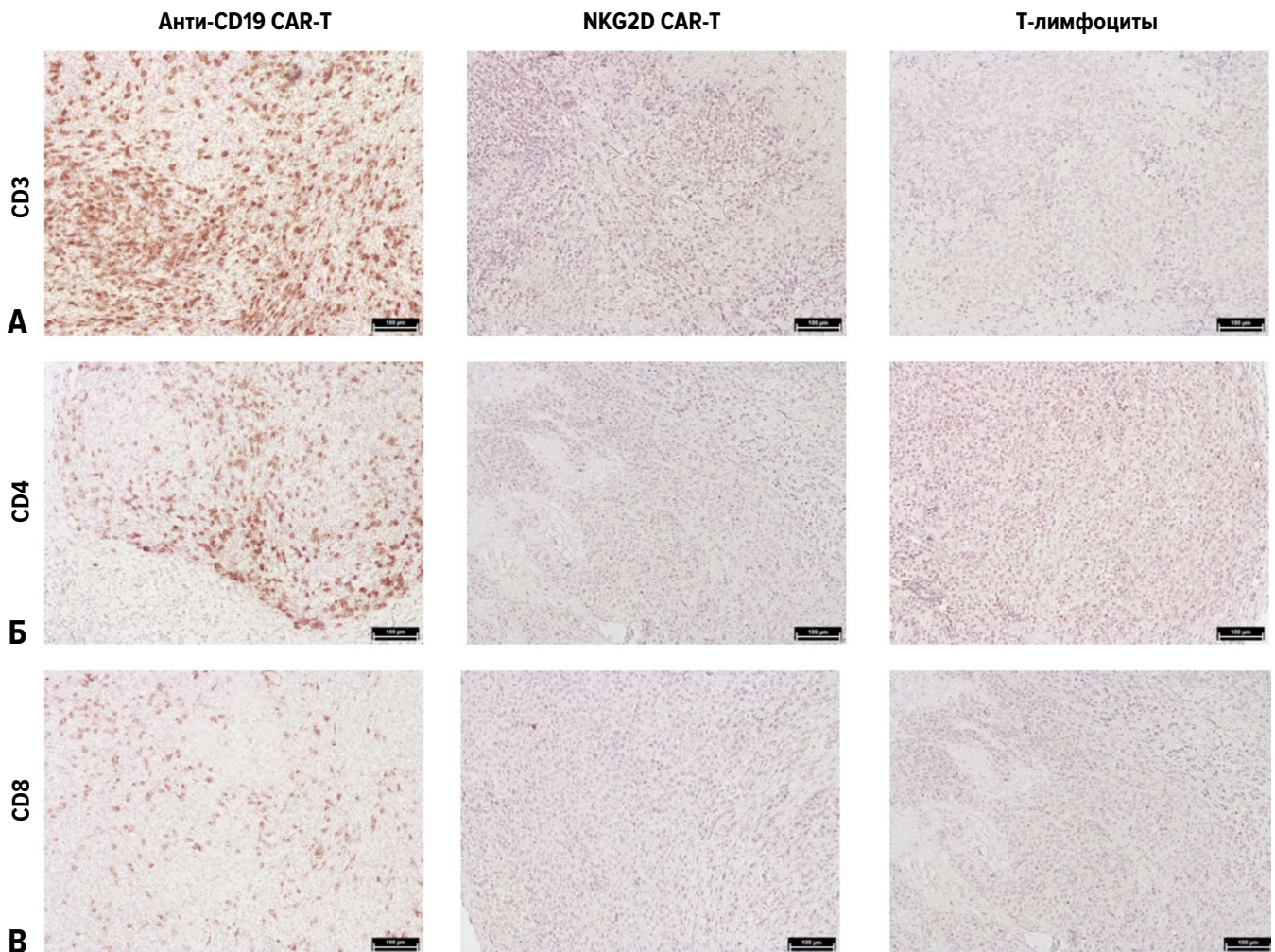


Рис. 7. Результаты иммуногистохимического окрашивания парафиновых срезов опухолей HeLa_CD19, извлеченных из мышей линии NSG-SGM3, спустя 10 дней после введения инфильтрированных анти-CD19 CAR T-клеток, NKG2D CAR T-клеток и T-лимфоцитов, по различным маркерам. Микрофотографии краевой зоны опухоли:
 А — окрашивание по антигену CD3; Б — окрашивание по антигену CD4; В — окрашивание по антигену CD8

Fig. 7. The results of immunohistochemical staining of NSG-SGM3 mice HeLa_CD19 tumor paraffin sections 10 days after infiltrated CAR-T anti-CD19, CAR-T NKG2D, and T-lymphocyte injections, with respect to various markers. Microphotographs of tumor marginal zone:
 A — antigen CD3 staining; Б — antigen CD4 staining; В — antigen CD8 staining

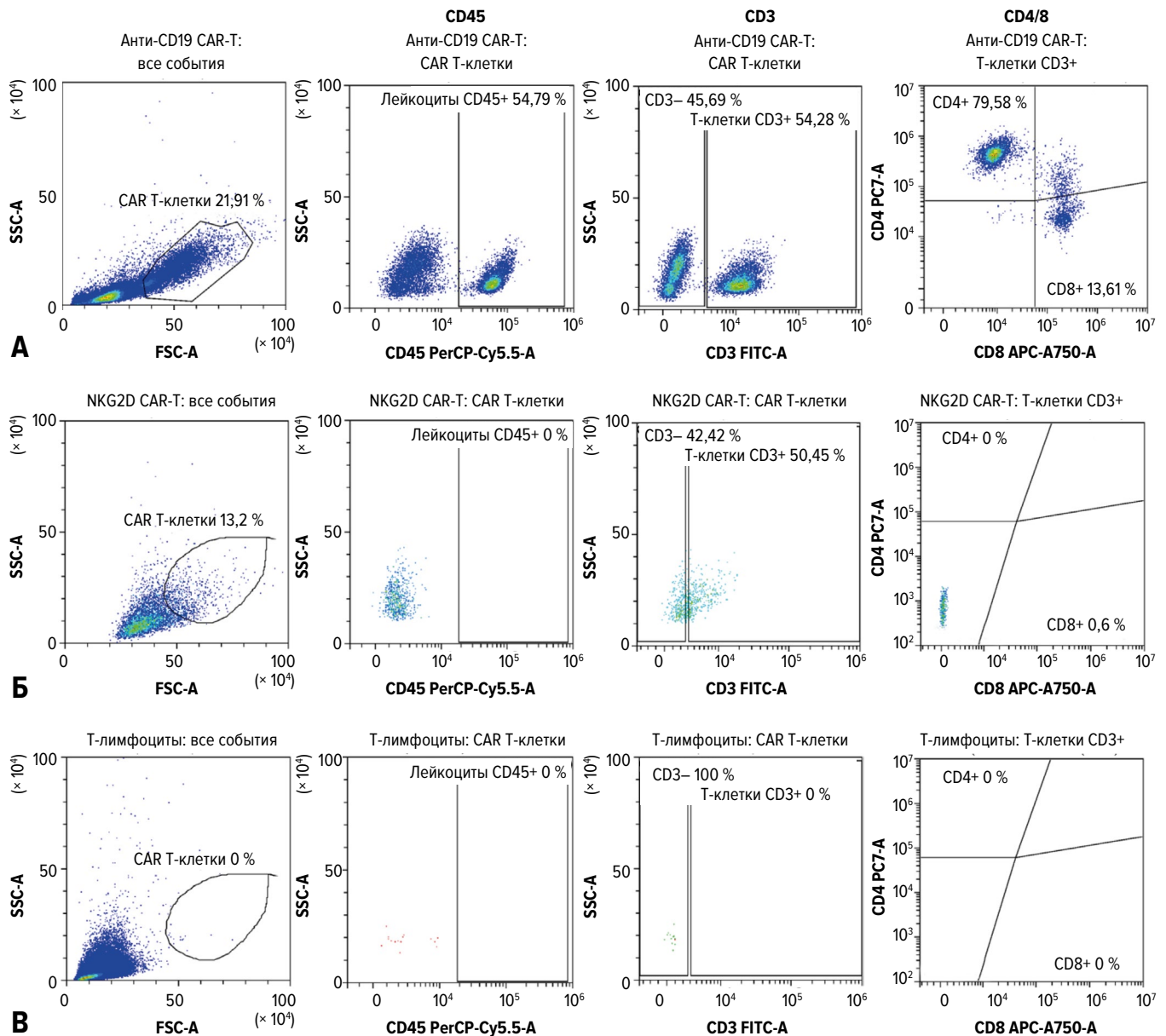


Рис. 8. (А–В) Цитофлюориметрическая оценка пролиферации анти-CD19 CAR Т-клеток, NKG2D CAR Т-клеток и Т-лимфоцитов *in vivo* в периферической крови спустя 10 дней после их инъекции мышам линии NSG-SGM3

Fig. 8. (A–B) Cytofluorimetric assessment of CAR-T anti-CD19, CAR-T NKG2D, and T-lymphocyte *in vivo* proliferation in peripheral blood 10 days after their injection in NSG-SGM3 mice

В соответствии с распределением интенсивного окрашивания по маркеру Т-клеток CD3 в краевой зоне срезов опухолей мышей NSG-SGM3 экспериментальной группы с введением анти-CD19 CAR Т-клеток, а также верификацией CAR Т-клеток по маркерам CD4 и CD8 следует вывод о высоком уровне цитотоксической активности, персистенции и жизнеспособности данных клеток.

Оценка пролиферативной активности CAR Т-лимфоцитов *in vivo*

Пролиферативный потенциал инъекцированных CAR Т-клеток оценивали в ходе цитофлюориметрического анализа образцов периферической крови мышей линии NSG-SGM3 (рис. 8).

Согласно иммунофенотипированию клеток по маркерам CD45, CD3, CD4/8, субпопуляция CAR Т-клеток была обнаружена только в образцах перифе-

рической крови группы мышей NSG-SGM3 с введением анти-CD19 CAR Т-клеток.

Оценка цитотоксической активности CAR

Т-лимфоцитов *in vivo* по уровню IFN- γ в сыворотке

В экспериментальных моделях мышей линии NSG-SGM3 также исследовали уровень цитокина IFN- γ , позволяющий оценить функциональную цитотоксическую активность инъекцированных CAR Т-клеток (рис. 9).

Согласно полученным данным иммуноферментного анализа, концентрация цитокина IFN- γ в аутоплазме мышей группы с введением анти-CD19 CAR Т-клеток составила 11,89 пкг/мл, а в группе с введением NKG2D CAR Т-клеток — 0,57 пкг/мл, что в 21 раз ниже и не превосходит низкий уровень контрольной группы мышей с введением Т-лимфоцитов — 1,054 пкг/мл.

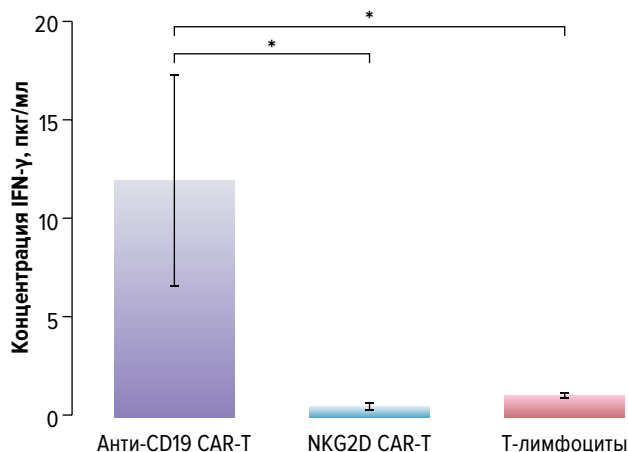


Рис. 9. Содержание интерферона-γ (IFN-γ) в сыворотке мышей линии NSG-SGM3 *in vivo* спустя 10 дней после введения анти-CD19 CAR Т-клеток, NKG2D CAR Т-клеток и Т-лимфоцитов
* $p = 0,0079$, тест Манна—Уитни.

Fig. 9. Interferon-γ (IFN-γ) concentration in NSG-SGM3 mice serum *in vivo* 10 days after CAR-T anti-CD19, CAR-T NKG2D, and T-lymphocyte injections

* $p = 0.0079$, Mann-Whitney test.

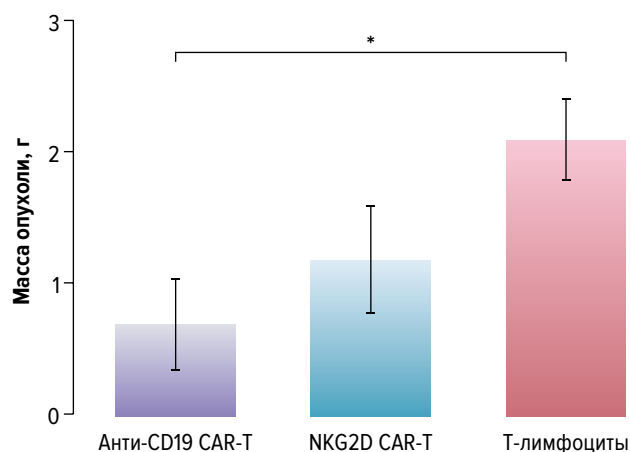


Рис. 10. Размер опухолей HeLa_CD19, извлеченных из мышей линии NSG-SGM3, спустя 10 дней после введения анти-CD19 CAR Т-клеток, NKG2D CAR Т-клеток и Т-лимфоцитов
* $p = 0,0142$, *t*-тест.

Fig. 10. HeLa_CD19 tumor size in NSG-SGM3 mice 10 days after CAR-T anti-CD19, CAR-T NKG2D, and T-lymphocyte injections

* $p = 0.0142$, *t*-test.

Оценка размера опухолевого ксенографта после применения CAR Т-клеточной терапии

Спустя 10 дней после введения CAR Т-клеток мыши экспериментальных групп были подвергнуты эвтаназии, а опухолевые ксенографты были извлечены для анализа их морфологических параметров. Опухолевые ксенографты оценивались по разнице в массе между группами (рис. 10).

Согласно измерениям массы опухолей, полученных из модельных мышей линии NSG-SGM3, наименьшими по размеру были опухоли, извлеченные в экспериментальной группе с введением анти-CD19 CAR Т-клеток: их масса составила 0,72 г. Масса опухолей в группах с введением Т-лимфоцитов и NKG2D CAR Т-клеток составила 2,12 и 1,2 г соответственно. Таким образом, наблюдается уменьшение размера опухолевого ксенографта в группе анти-CD19 CAR Т-клеток в 3 раза по сравнению с контрольной группой введения Т-лимфоцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ

К настоящему времени в рамках терапии гематологических опухолей Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) официально зарегистрировано 7 CAR Т-клеточных препаратов. Среди них анти-CD19 CAR-T были Breyanzi (лизикабтаген маралейсел) для лечения рецидивов и рефрактерной диффузной В-крупноклеточной лимфомы, Kymriah (тисагенлеклейсел), Yescarta (аксикабтаген силолейсел) и Tecartus (брексукабтаген аутолейсел) для лечения острого В-линейного лимфобластного лейкоза. В 2021 и 2022 гг. также впервые были одобрены CAR Т-клеточные препараты Abecma (идекабтаген виклейсел) и Carvykti (цилтакабтаген аутолейсел), направленные против антигена BCMA, у пациентов с рецидивами и рефрактерной множественной миеломой. Официально зарегистрированные

биомедицинские CAR Т-препараты в рамках терапии новообразований системы крови ознаменовали выдающийся прорыв в лечении гематологических злокачественных опухолей. Молекулярное устройство перечисленных выше CAR Т-клеточных продуктов включает наличие в структуре дополнительных коактивирующих молекул 4-1BB и CD28, которые обеспечивают достаточную персистенцию и выживаемость CAR Т-клеток при введении в организм.

В настоящей работе изучались функциональные свойства Т-лимфоцитов, экспрессирующих химерный антигенный рецептор NKG2D, содержащий в структурно-молекулярной организации вспомогательный белок DAP10, который обеспечивает передачу активационного сигнала рецептора. NKG2D CAR Т-клеткам противопоставлялись анти-CD19 CAR Т-клетки, которые отличаются присутствием активационного домена CD28 в молекулярной последовательности химерного антигенного рецептора (см. рис. 2). Таким образом, в работе были исследованы функциональные свойства CAR, обладающих специфичностью к опухолевым антигенам, однако отличающихся по организации активационного звена сигнального пути: активация и стимуляция за счет вспомогательного белка (CAR NKG2D), коактивация за счет структурного домена (CAR-anti_CD19).

Согласно полученным результатам *in vitro* и *in vivo* экспериментов, NKG2D CAR Т-клетки обладают более низкими цитотоксической активностью, синтезом IFN-γ при сокультивировании с линией-мишенью. Низкий уровень инфильтрации, отсутствие персистенции NKG2D CAR Т-клеток *in vivo* демонстрируют сниженную функциональную активность этих клеток по сравнению с анти-CD19 CAR Т-клетками и указывают на необходимость совершенствования молекулярной структуры химерного антигенного рецептора. Структура используемого в работе химерного антигенного рецептора NKG2D сходна с таковой молекул CAR первого поколения, содержащих только

внутриклеточный домен CD3 ζ и показавших низкую цитотоксическую и пролиферативную активность ввиду недостатка передачи костимулирующего сигнала от доменов CD27, CD28, CD134, CD137 и сигнала цитокинов (например, IL-2) [24]. По этой причине созданные модификации CAR NKG2D, сочетающие в структуре комбинацию костимулирующих доменов, проявляют большую степень персистенции и цитотоксической активности [18, 19]. С другой стороны, наличие костимулирующих доменов вместо адаптерного белка позволит обеспечить ожидаемый специфичный цитотоксический эффект, но может привести и к выраженной гиперцитокинемии с летальным исходом [25]. В связи с этим сниженный потенциал персистенции NKG2D CAR Т-клеток без костимулирующих доменов может применяться в качестве кратковременной эффективной опухолевой элиминации.

Другим фактором, вносящим определенный вклад в снижение эффективности CAR NKG2D, вероятно, является клеточный элемент фратрицида (братоубийство, от лат. *frater* — брат и *caedo* — убиваю). Снижение цитотоксичности за счет фратрицида — явление, влияющее на эффективность CAR Т-клеточных препаратов рецептора NKG2D. Для разрешения данной проблемы существуют различные подходы, включающие модуляцию экспрессии лигандов рецептора NKG2D на самих NKG2D CAR Т-клетках с помощью коротких шпилечных последовательностей мРНК к лигандам MICA и MICB [26], а также добавление ингибитора PI3K-киназы LY294002 [27], что уже применялось в отношении CAR Т-клеточных препаратов с рецепторами NKG2D CYAD-02 и CYAD-01.

Таким образом, наиболее эффективным методом решения проблемы сниженной персистенции и цитотоксичности CAR Т-клеточных препаратов NKG2D может быть как введение костимулирующих доменов, что, однако, увеличивает риски гиперцитокинемии и неспецифической активности ввиду длительной персистенции, так и использование множественных доз для поддержания противоопухолевого ответа без длительной персистенции CAR Т-клеток в организме. Снижение взаимного уничтожения NKG2D CAR Т-клеток также способно увеличить противоопухолевую эффективность данных клеточных препаратов. Дополнительным вариантом применения NKG2D CAR Т-клеток может стать схема их введения данных перед терапией целевым специфичным препаратом CAR Т-клеток с костимулирующими доменами. Цель этого дополнительного этапа заключается в снижении опухолевой нагрузки во избежание побочных эффектов в виде синдрома лизиса опухоли и гиперцитокинемии, что часто происходит при использовании CART-клеток с доменами CD28 и 4-1BB в случае высокой опухолевой нагрузки. Данная схема позволяет избежать сложных аспектов клональной эволюции опухолей и может стать эффективным шагом в персонализированном подходе к терапии опухолевых заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анти-CD19 CAR Т-лимфоциты характеризуются более выраженным цитотоксическим эффектом в экспери-

ментальных условиях как *in vitro*, так и *in vivo* по сравнению с NKG2D CAR Т-клетками. Степень пролиферации анти-CD19 CAR Т-клеток и их инфильтрации в мышечных ксенографтных моделях в значительной степени выше уровней, полученных при введении NKG2D CAR Т-клеток. Однократное введение NKG2D CAR Т-клеток способствует лишь кратковременному уменьшению опухоли.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022 г.).

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: А.В. Петухов.

Сбор и обработка данных: К.А. Левчук, С.А. Осипова, А.В. Онопченко.

Предоставление материалов исследования: О.Н. Демидов, М.Л. Васютина, Э.Р. Булатов, А.Х. Валиуллина, С.А. Осипова, А.В. Онопченко.

Анализ и интерпретация данных: К.А. Левчук, А.В. Петухов.

Подготовка рукописи: К.А. Левчук.

Окончательное одобрение рукописи: А.В. Петухов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Saez-Borderias A, Guma M, Angulo A, et al. Expression and function of NKG2D in CD4+ T cells specific for human cytomegalovirus. *Eur J Immunol.* 2006;36(12):3198–206. doi: 10.1002/eji.200636682.
2. Allez M, Tieng V, Nakazawa A, et al. CD4+NKG2D+ T cells in Crohn's disease mediate inflammatory and cyto-toxic responses through MICA interactions. *Gastroenterology.* 2007;132(7):2346–58. doi: 10.1053/j.gastro.2007.03.025.
3. Dai Z, Turtle CJ, Booth GC, et al. Normally occurring NKG2D+CD4+ T cells are immunosuppressive and inversely correlated with disease activity in juvenile-onset lupus. *J Exp Med.* 2009;206(4):793–805. doi: 10.1084/jem.20081648.
4. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(10):781–90. doi: 10.1038/nri1199.
5. Le Bert N, Gasser S. Advances in NKG2D ligand recognition and responses by NK cells. *Immunol Cell Biol.* 2014;92(3):230–6. doi: 10.1038/icb.2013.111.
6. Rabinovich B, Li J, Wolfson M, et al. NKG2D splice variants: a reexamination of adaptor molecule associations. *Immunogenetics.* 2006;58(2–3):81–8. doi: 10.1007/s00251-005-0078-x.
7. Lanier LL. DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity. *Immunol Rev.* 2009;227(1):150–60. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00720.x.
8. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, et al. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol.* 2013;31(1):413–41. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095951.
9. Luo QZ, Lin L, Gong Z, et al. Positive association of major histocompatibility complex class I chain-related gene A polymorphism with leukemia susceptibility in the people of Han nationality of Southern China. *Tissue Antigens.* 2011;78(3):178–84. doi: 10.1111/j.1399-0039.2011.01748.x.
10. Kim H, Byun JE, Yoon SR, et al. SARS-CoV-2 peptides bind to NKG2D and increase NK cell activity. *Cell Immunol.* 2022;371:104454. doi: 10.1016/j.celimm.2021.104454.
11. Farzad F, Yaghoobi N, Jabbari-Azad F, et al. Prognostic Value of Serum MICA Levels as a Marker of Severity in COVID-19 Patients. *Immunol Invest.* 2022;1–11. doi: 10.1080/08820139.2022.2069035.

12. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, et al. Costimulation of CD8 α -phbeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol*. 2001;2(3):255–60. doi: 10.1038/85321.
13. Ehrlich LI, Ogasawara K, Hamerman JA, et al. Engagement of NKG2D by cognate ligand or antibody alone is insufficient to mediate costimulation of human and mouse CD8 $^{+}$ T cells. *J Immunol*. 2005;174(4):1922–31. doi: 10.4049/jimmunol.174.4.1922.
14. O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem J*. 2008;409(3):635–49. doi: 10.1042/BJ20071493.
15. Zhang T, Lemoi BA, Sentman CL. Chimeric NK-receptor-bearing T cells mediate antitumor immunotherapy. *Blood*. 2005;106(5):1544–51. doi: 10.1182/blood-2004-11-4365.
16. Zhang T, Barber A, Sentman CL. Generation of antitumor responses by genetic modification of primary human T cells with a chimeric NKG2D receptor. *Cancer Res*. 2006;66(11):5927–33. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0130.
17. Chang YH, Connolly J, Shimasaki N, et al. A chimeric receptor with NKG2D specificity enhances natural killer cell activation and killing of tumor cells. *Cancer Res*. 2013;73(6):1777–86. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3558.
18. Song DG, Ye Q, Santoro S, et al. Chimeric NKG2D CAR-expressing T cell-mediated attack of human ovarian cancer is enhanced by histone deacetylase inhibition. *Hum Gene Ther*. 2013;24(3):295–305. doi: 10.1089/hum.2012.143.
19. Lehner M, Gotz G, Proff J, et al. Redirecting T cells to Ewing's sarcoma family of tumors by a chimeric NKG2D receptor expressed by lentiviral transduction or mRNA transfection. *PLoS One*. 2012;7(2):e31210. doi: 10.1371/journal.pone.0031210.
20. Sentman CL, Meehan KR. NKG2D CARs as cell therapy for cancer. *Cancer J*. 2014;20(2):156–9. doi: 10.1097/PP0.000000000000029.
21. Barber A, Zhang T, DeMars LR, et al. Chimeric NKG2D receptor-bearing T cells as immunotherapy for ovarian cancer. *Cancer Res*. 2007;67(10):5003–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4047.
22. Chang YH, Connolly J, Shimasaki N, et al. A chimeric receptor with NKG2D specificity enhances natural killer cell activation and killing of tumor cells. *Cancer Res*. 2013;73(6):1777–86. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3558.
23. Barber A, Meehan KR, Sentman CL. Treatment of multiple myeloma with adoptively transferred chimeric NKG2D receptor-expressing T cells. *Gene Ther*. 2011;18(5):509–16. doi: 10.1038/gt.2010.174.
24. Smith AJ, Oertle J, Warren D, Prato D. Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy for malignant cancers: Summary and perspective. *J Cell Immunother*. 2016;2(2):59–68. doi: 10.1016/j.jocit.2016.08.001.
25. Ng YY, Tay JCK, Li Z, et al. T Cells Expressing NKG2D CAR with a DAP12 Signaling Domain Stimulate Lower Cytokine Production While Effective in Tumor Eradication. *Mol Ther*. 2021;29(1):75–85. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.08.016.
26. Fontaine M, Demoulin B, Bornschein S, et al. Next generation NK-G2D-based CAR T-cells (CYAD-02): co-expression of a single shRNA targeting MICA and MICB improves cell persistence and anti-tumor efficacy in vivo. *Blood*. 2019;134(Suppl_1):3931. doi: 10.1182/blood-2019-129998.
27. Breman E, Demoulin B, Agaoglu S, et al. Overcoming Target Driven Fratricide for T Cell Therapy. *Front Immunol*. 2018;9:2940. doi: 10.3389/fimmu.2018.02940.

