

I научная конференция «Клеточные технологии в онкогематологии»

30 ноября 2023 г., Санкт-Петербург

ТЕЗИСЫ РАБОТ И ДОКЛАДОВ

ПРИЛОЖЕНИЕ К ЖУРНАЛУ

«Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика»

том 17, № 1, 2024

Уважаемые коллеги!

Вы держите в руках приложение к журналу «Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика», в котором опубликованы тезисы I научной конференции «Клеточные технологии в онкогематологии». Конференция проводилась 30 ноября 2023 г. в г. Санкт-Петербурге.

Свои работы в рамках конференции представили известные специалисты в области клеточных технологий, а также ведущие гематологи из разных регионов Российской Федерации. Конференция проходила в очном и онлайн-форматах. В рамках конференции было представлено 25 устных докладов. Записи докладов доступны по ссылке: <https://www.youtube.com/watch?v=9Uls5w9wH58> и на официальном сайте ассоциации HOTS: <https://hotsru.com/01122023>. К публикации было принято 14 работ ведущих экспертов в области клеточной терапии, в которых представлены результаты новейших исследований и разработок в области клеточных технологий для лечения онкогематологических заболеваний.

С уважением,
Организационный комитет
I научной конференции «Клеточные технологии в онкогематологии»

Содержание

Цепецентрические Т-клеточные рецепторы и возможности их использования в медицине	3
<i>Казанский Д.Б., Калинина А.А., Хромых Л.М.</i>	
Морфофункциональные и фенотипические характеристики мезенхимных стволовых клеток	4
<i>Власенко Р.Я., Ситдикова С.М., Фатхуллин Р.Р., Киселевский М.В.</i>	
Перспективы применения онколитических вирусных средств в онкогематологии и при солидных опухолях	5
<i>Пестов Н.Б., Назаренко А.С., Бирюкова Ю.К., Колясникова Н.М., Ишмухаметов А.А.</i>	
Перспективные мишени для гуманизированных моноклональных антител и CAR Т-клеточных продуктов при гематологических злокачественных опухолях	6
<i>Мисюрин А.В., Мисюрин В.Ф., Финашутина Ю.П., Лапшина Н.А., Солопова О.Н., Ларина М.В., Алиев Т.К., Кирпичников М.П.</i>	
Прогностическое значение экспрессии CD200 на бластных клетках в дебюте острого миелоидного лейкоза	7
<i>Гиршова Л.Л., Шатилова А.А., Будаева И.Г., Матвиенко Ю.Д., Левчук К.А., Миролубова Ю.В., Гиршова П.А., Ломаиа Е.Г.</i>	
Измененная форма Flt3-лиганда в составе безантительного Flt3m-CAR и ее роль в таргетировании рецептора Flt3 на поверхности опухолевых клеток в модели in vitro острого миелоидного лейкоза	9
<i>Майорова В.Е., Моллаев М.Д., Вихрева П.Н., Кибардин А.В., Масчан М.А., Ларин С.С.</i>	
Инновационная система доставки гранзима В в опухолевые клетки	10
<i>Мисюрин В.А., Ярош И.В., Рудакова А.А., Лыжко Н.А., Газизова А.Р., Дмитриева М.В., Бармашов А.А., Голубцова Н.В., Барышникова М.А., Краснюк И.И.</i>	
Разработка и тестирование новых CAR Т-клеточных продуктов в онкогематологии	11
<i>Беловежец Т.Н., Кулемзин С.В., Горчаков А.А.</i>	
Функциональное исследование CAR Т-лимфоцитов против мишеней CD87, PD-L-1/2 и лигандов активационного рецептора NKG2D для оценки возможности их применения при злокачественных новообразованиях	13
<i>Левчук К.А., Торопова Я.Г., Шатилова А.А., Гиршова Л.Л., Ломаиа Е.Г., Петухов А.В.</i>	
Оригинальный протокол производства CAR Т-клеточных продуктов на основе одновременной активации и селекции Т-лимфоцитов с использованием биспецифических антител	15
<i>Гапоненко И.Н., Потанин А.А., Маркелов В.В., Сеничкина Д.А., Сергеев В.С., Шакирова А.И., Лепик К.В., Кулагин А.Д.</i>	
Оптимизация геометрических условий трансдукции Т-клеток с использованием микрофлюидных систем	16
<i>Маркелов В.В., Арабули К.В., Гапоненко И.Н., Сергеев В.С., Сеничкина Д.А., Потанин А.А., Лаушкина В.О., Зюзин М.В., Шакирова А.И., Лепик К.В., Кулагин А.Д.</i>	
Российские нейтрализующие антитела против SARS-CoV-2 широкого спектра действия	18
<i>Таранин А.В.</i>	
Комбинированная терапия глиобластомы с помощью CAR НК-клеточных препаратов и модифицированных онколитических вирусов в эксперименте	19
<i>Юсубалиева Г.М., Липатова А.В., Ширманова М.В., Баклаушев В.П.</i>	
Анализ эффективности получения CAR Т-лимфоцитов у здоровых доноров и пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями	20
<i>Глуценко Д.Ю., Оганнисян А.А., Мабудзаде Ч.К., Дудина Г.А.</i>	

Цепецентрические Т-клеточные рецепторы и возможности их использования в медицине

Д.Б. Казанский*, А.А. Калинина, Л.М. Хромых

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

* **Контакты:** Дмитрий Борисович Казанский, kazansky1@yandex.ru

Chain-Centric T-Cell Receptors and Their Potential for Medical Use

DB Kazanskiĭ, AA Kalinina, LM Khromykh

NN Blokhin National Medical Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh.,
Moscow, Russian Federation, 115478

* **Correspondence:** Dmitrii Borisovich Kazanskii, kazansky1@yandex.ru

Введение. Применение Т-лимфоцитов с химерными антигенными рецепторами (CAR-T) для лечения онкологических заболеваний ограничено опухоль-ассоциированными антигенами, которые могут присутствовать на поверхности клеток, подвергшихся злокачественной трансформации. В отличие от CAR-T использование Т-клеточных рецепторов (TCR) может быть нацелено на широкий спектр неоантигенов опухоли, возникших вследствие мутаций, однако подразумевает большой и продолжительный объем работы по персонализации проводимой терапии. Сокращение этого объема становится возможным в результате открытия цепецентрических TCR, специфичность которых диктует входящая в их состав α -цепь.

Цель. Исследовать возможности формирования специфического клеточного иммунитета с помощью методов переноса генов α -цепей цепецентрических TCR.

Материалы и методы. В работе использовался широкий спектр методов, включающих секвенирование нового поколения (NGS), биоинформационный анализ репертуаров TCR, генное клонирование, ретровирусную трансдукцию и трансгенез, проточную цитофлуориметрию, адоптивный перенос модифицированных Т-лимфоцитов, оценку противоопухолевого и противои инфекционного иммунитета, методы проведения доклинических исследований.

Результаты. Показано, что как трансдукция и последующий адоптивный перенос Т-лимфоцитов, так и трансгенез α -цепей цепецентрических TCR на стадии зиготы безопасны и создают у животных пул Т-лимфоцитов, эффективно противостоящих опухоли или инфекции без каких-либо нарушений функций организма либо подавления иммунного ответа на чужеродные антигены.

Заключение. Выявлены две перспективные области применения цепецентрических TCR. Первая связана со снижением временных и трудовых затрат на получение терапевтических Т-клеточных продуктов для адоптивной иммунотерапии онкологических заболеваний и инфекций, резистентных к антибиотикам, а также тех, против которых не разработаны эффективные вакцины. Вторая открывает возможности формирования ранее неизвестного способа иммунной защиты организма — врожденного специфического иммунитета к инфекционным заболеваниям.

Ключевые слова: цепецентрический Т-клеточный рецептор, трансгенез, ретровирусная трансдукция, адоптивная иммунотерапия, Т-клеточный продукт, иммунитет.

Источники финансирования: работа поддержана грантом РФФ № 22-15-00342.

Морфофункциональные и фенотипические характеристики мезенхимных стволовых клеток

*Р.Я. Власенко, С.М. Ситдикова, Р.Р. Фатхуллин, М.В. Киселевский**

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

* **Контакты:** Михаил Валентинович Киселевский, kisele@inbox.ru

Morphofunctional and Phenotypic Characteristics of Mesenchymal Stem Cells

*RYa Vlasenko, SM Sitdikova, RR Fatkhullin, MV Kiselevskii**

NN Blokhin National Medical Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

* **Correspondence:** Mikhail Valentinovich Kiselevskii, kisele@inbox.ru

Введение. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) формируют микроокружение костного мозга, именуемое нишами гемопоэтических стволовых клеток, и поддерживают кроветворение [1, 2]. МСК также обладают толлерогенными свойствами. Эти виды активности МСК используются при лечении реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и стимуляции гемопоэза после трансплантации аллогенных (гаплоидентичных) гемопоэтических клеток [3]. Однако большая вариабельность результатов отдельных клинических исследований требует разработки стандартизованных критериев биомедицинского продукта на основе МСК.

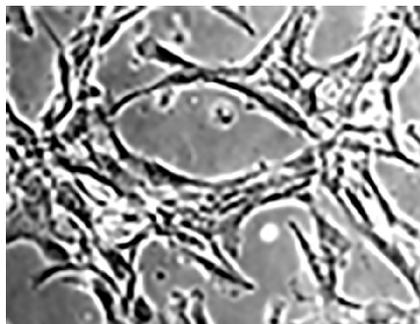
Цель. Оценить фенотипические и морфофункциональные особенности МСК в процессе культивирования.

Материалы и методы. Аспираты костного мозга, полученные в стерильных условиях, разводили 2 раза

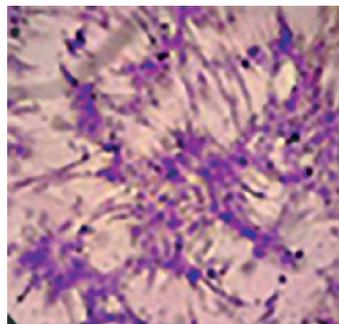
средой α -МЕМ, в градиенте плотности фиколла выделяли моноклеарную фракцию. Через 48 ч инкубации клетки, не прикрепившиеся к пластику, удаляли и продолжали культивирование. В супернатантах культур МСК определяли содержание цитокинов и рассчитывали медианные значения. Экспрессию поверхностных маркеров клетками культуры МСК оценивали методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты. МСК после внесения в культуральный флакон в течение нескольких часов распластывались на подложке, образуя клетки полигональной формы, с формированием очагов пролиферации вокруг клоногенных клеток из множества длинных веретеновидных клеток, образующих замкнутые циркулярные структуры по типу прекапилляров (рис. 1).

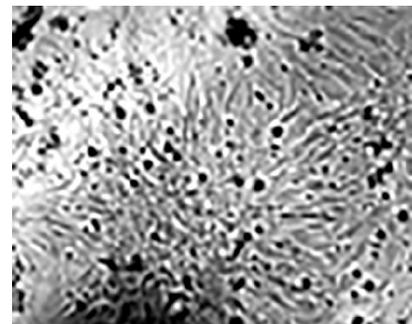
МСК первых 4 пассажей характеризовались высоким уровнем экспрессии маркеров CD90, CD73 и CD105 при отсутствии гемопоэтических стволовых клеток CD45+. Стволовклеточный маркер CD34



МСК формируют замкнутые циркулярные структуры



МСК. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$



Клоногенный рост культуры МСК

практически не определялся. При исследовании содержания 11 цитокинов в супернатантах МСК обнаружен чрезвычайно высокий уровень интерлейкинов (IL-6, IL-8) и MCP-1 при незначительном содержании противовоспалительных цитокинов. Длительное культивирование, а также большое количество пассажей приводят к «старению» МСК. В этих условиях снижается пролиферативная активность МСК, экспрессии маркера Ki-67 и происходит утрата целевых маркеров МСК.

Заключение. Для клинического использования могут быть рекомендованы МСК первых двух пассажей. В случае лечения РТПХ необходимо обращать внимание на цитокиновый профиль МСК, подбирая такие условия культивирования, при которых не будет иметь место гиперпродукция биорегуляторов,

участвующих в патогенезе цитокинового шторма и РТПХ.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, фенотип, морфология, цитокиновый профиль.

ЛИТЕРАТУРА

1. Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, et al. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*. 2006;107(5):1878–88. doi: 10.1182/blood-2005-706-2211.
2. Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(4):290–301. doi: 10.1038/nri2279.
3. Ringden O, Baygan A, Remberger M, et al. Placenta-derived decidual stromal cells for treatment of severe acute graft-versus-host disease. *Stem Cells Transl Med*. 2018;7(4):325–31. doi: 10.1002/sctm.17-0167.

Перспективы применения онколитических вирусных средств в онкогематологии и при солидных опухолях

Н.Б. Пестов*, А.С. Назаренко, Ю.К. Бирюкова, Н.М. Колясникова, А.А. Ишмухаметов

ФГАНУ «ФНЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1, Москва, Российская Федерация, 108819

* **Контакты:** Николай Борисович Пестов, pestov_nb@chumakovs.su; nayeoff@yahoo.com

Perspectives for the Use of Oncolytic Viral Agents in Oncohematology and in Solid Tumors

NB Pestov*, AS Nazarenko, YuK Biryukova, NM Kolyasnikova, AA Ishmukhametov

MP Chumakov Federal Research Center for Immunobiological Drug Development (Institute for Poliomyelitis Research), 8 korp. 1, Moskovskii poselenie, poselok "Institute for Poliomyelitis Research", Moscow, Russian Federation, 108819

* **Correspondence:** Nikolai Borisovich Pestov, pestov_nb@chumakovs.su; nayeoff@yahoo.com

Введение. В отличие от онкогенных вирусов (таких, как вирус Эпштейна—Барр) в настоящее время значительное число вирусов изучается в качестве противоопухолевых средств. Онколитическая виротерапия является разновидностью иммунотерапии и использует природные или модифицированные онколитические вирусы (ОлВ) для избирательного заражения опухолевых клеток, не нанося существенного вреда здоровым клеткам. Репликация ОлВ может вызывать как непосредственный лизис, так и мощный противоопухолевый иммунный ответ.

Цель. Анализ опыта разработок ОлВ для онкогематологии и терапии солидных опухолей, оценка возможностей применения.

Материалы и методы. Поиск научной и иной литературы по ключевым словам, критическое изучение.

Результаты. В настоящее время уже существует множество ОлВ, показавших хорошие результаты в доклинических моделях *in vitro* и *in vivo*. Одобрено несколько ОлВ в разных странах, наиболее известные из которых Imlygic (США, меланома) и Delytact (Япония, глиобластома). При этом наиболее успешной платформой на сегодня являются ОлВ на основе вируса простого герпеса 1 (HSV-1). Однако, поскольку многие другие вирусы обладают не меньшим онколитическим потенциалом, а в онкогематологии существует потребность в разработке

новых средств против рецидивов и/или рефрактерного течения лимфом и лейкозов (в особенности против множественной миеломы), во всем мире исследуются также вирус кори, реовирусы, вирус осповакцины, некоторые флавивирусы и др., причем некоторые из них уже демонстрируют неплохие результаты в ранних фазах клинических исследований. Большим преимуществом ОлВ является возможность вооружать их геномы различными трансгенами (наиболее популярны интерфероны и гранулоцитарно-макрофагальные колониестимулирующие факторы), а также синергически комбинировать с другими средствами (циклофосфамид, бортезомиб, леналидомид, ниволумаб, препараты клеточной терапии и т. д.).

Заключение. Важно подчеркнуть, что распространенной ошибкой служит мнение о принципиальной разнице между стратегиями противоопухолевой терапии в онкогематологии и при различных солидных опухолях. В обоих случаях для успешной разработки ОлВ принципиальным фактором считается доставка столь сложного терапевтического средства, как ОлВ. Ее решение требует интенсивных исследований и взаимодействия между специалистами в соответствующих областях вирусологии, биомедицинской химии, генной инженерии и клинической онкологии.

Ключевые слова: онколитические вирусы, онкогенные вирусы, рак, лимфома, лейкоз, генная терапия.

Перспективные мишени для гуманизированных моноклональных антител и CAR T-клеточных продуктов при гематологических злокачественных опухолях

**А.В. Мисюрин^{1*}, В.Ф. Мисюрин¹, Ю.П. Финашутина¹, Н.А. Лапшина¹,
О.Н. Солопова², М.В. Ларина³, Т.К. Алиев³, М.П. Кирпичников⁴**

¹ ООО «ГеноТехнология», ул. Профсоюзная, д. 104, Москва, Российская Федерация, 117485

² ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

³ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, Москва, Российская Федерация, 117997

⁴ Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Москва, Российская Федерация, 119234

* **Контакты:** Андрей Витальевич Мисюрин, gentech@mail.ru

Promising Targets for Humanized Monoclonal Antibodies and CAR-T Products in Hematological Malignancies

AV Misyurin¹, VF Misyurin¹, YuP Finashutina¹, NA Lapshina¹, ON Solopova², MV Larina³, TK Aliev³, MP Kirpichnikov⁴

¹ *GenoTekhnologiya, 104 Profsoyuznaya ul., Moscow, Russian Federation, 117485*

² *NN Blokhin National Medical Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478*

³ *MM Shemyakin and YuA Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 16/10 Miklukho-Maklaya ul., Moscow, Russian Federation, 117997*

⁴ *Department of Biology, MV Lomonosov Moscow State University, 1 korp. 12, Leninskie gory, Moscow, Russian Federation, 119234*

* **Correspondence:** *Andrei Vitalevich Misyurin, gentech@mail.ru*

Введение. В качестве мишеней для иммунотерапии опухолевых заболеваний системы крови с помощью гуманизированных антител и Т/НК-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR)

чаще всего используют особые маркеры, которые появляются на поверхности клеток кроветворной и лимфоидной тканей в определенные фазы гемопоэза и обычно являются линейно-специфич-

ными. Например, для лечения В-клеточных опухолей в качестве мишеней используют CD19, CD20, CD22, CD33 и CD52, а при острых миелоидных лейкозах — CD33 и CD123. Однако во всех этих случаях цитотоксический эффект затрагивает не только опухолевые, но и здоровые клетки, имеющие на своей поверхности те же маркеры. Раково-тестикулярные антигены (РТА) экспрессируются только опухолевыми клетками, поэтому они представляются интересными и перспективными мишенями для лечения гематологических злокачественных опухолей с помощью гуманизированных антител и CAR T/NK-клеток.

Цель. Получить гуманизированные антитела против РТА PRAME и NY-ESO1 и показать их противоопухолевую активность на моделях *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы. Антигены PRAME и NY-ESO1 были получены генно-инженерным способом и использовались для разработки специфических моноклональных антител путем гибридомной технологии. Первичная последовательность антигенраспознающих локусов мышиных генов, кодирующих

моноклональные антитела против PRAME и NY-ESO1, была установлена по методу Сэнгера.

Результаты. На основе первичных последовательностей антигенраспознающих локусов мышиных генов, кодирующих моноклональные антитела против PRAME и NY-ESO1, был осуществлен дизайн и синтез гуманизированных антител против этих антигенов. Доказана их высокая специфичность и аффинность. На моделях *in vitro* и *in vivo* показана высокая противоопухолевая активность гуманизированных антител против РТА PRAME и NY-ESO1.

Заключение. Разработаны гуманизированные антитела против РТА PRAME и NY-ESO1. Эти антитела могут использоваться для лечения широкого спектра онкогематологических заболеваний, а также солидных опухолей. На основе гуманизированных антител против РТА PRAME возможно создание противоопухолевых CAR T/NK-клеток.

Ключевые слова: иммунотерапия, PRAME, гуманизированные антитела, раково-тестикулярные антигены.

Прогностическое значение экспрессии CD200 на бластных клетках в дебюте острого миелоидного лейкоза

Л.Л. Гиршова^{1*}, А.А. Шатилова¹, И.Г. Будаева², Ю.Д. Матвиенко¹,
К.А. Левчук¹, Ю.В. Миролубова¹, П.А. Гиршова¹, Е.Г. Ломаиа¹

¹ НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341

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

* **Контакты:** Лариса Леонидовна Гиршова, lgirshova@gmail.com

Prognostic Value of CD200 Expression in Blast Cells at the Onset of Acute Myeloid Leukemia

LL Girshova^{1*}, AA Shatilova¹, IG Budaeva², YuD Matvienko¹, KA Levchuk¹,
YuV Mirolyubova¹, PA Girshova¹, EG Lomaia¹

¹ Center for Personalized Medicine, 2 Akkuratova ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341

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

* **Correspondence:** Larisa Leonidovna Girshova, lgirshova@gmail.com

Введение. Новые знания о генетической гетерогенности острых миелоидных лейкозов (ОМЛ), полученные в последние годы, позволили улучшить результаты терапии этого прогностически неблагоприятного

заболевания. Однако химиорефрактерность и высокая частота рецидивов остаются серьезной проблемой и, как следствие, приводят к неутешительным долгосрочным результатам терапии ОМЛ. В совре-

менных исследованиях показано, что независимо от драйверных мутаций, инициирующих заболевание, начало и развитие ОМЛ сопровождаются ремоделированием микроокружения в среду, способствующую развитию опухоли, которое обеспечивает поддержку и защиту лейкозных стволовых клеток. При ОМЛ распространенной проблемой является ускользание опухолевых клеток от иммунитета, что служит эффективным механизмом выживания [1]. Один из наиболее важных механизмов уклонения от иммунитета — индукция различных коингибирующих рецепторов на Т-клетках и взаимодействие с их лигандами на клетках ОМЛ. CD-200 представляет собой трансмембранный гликопротеин клеточной поверхности, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов 1-го типа. Экспрессия CD200 обычно наблюдается в некоторой популяции Т- и В-лимфоцитов, нейронов и эндотелиальных клеток. При взаимодействии с рецептором (CD200R), расположенным на лейкоцитах и определенных популяциях Т-клеток, она вызывает иммуносупрессию. Экспрессия CD200 связана с неблагоприятным прогнозом при лимфопролиферативных заболеваниях. Из-за противоречивых результатов экспрессии CD200 при ОМЛ его значение у пациентов с этим заболеванием остается неопределенным.

Цель. Проанализировать прогностическое значение экспрессии CD200 на бластных клетках при впервые выявленном ОМЛ.

Материалы и методы. В исследование включен 51 пациент с впервые диагностированным ОМЛ, ранее не получавший лечения. Медиана возраста составила 46 лет (диапазон 21–70 лет). Согласно классификации European LeukemiaNet (ELN), 16,4 % пациентов отнесены к группе низкого риска, 45,5 % — промежуточного риска и 38,1 % — высокого. До начала терапии у всех пациентов определяли иммунофенотип

опухолевого клона, оценивали экспрессию CD200 на бластных клетках. Больным с соматически сохраненным статусом проводилась стандартная программная терапия: индукция в режиме «7+3» и консолидация с использованием цитарабина в высоких дозах [HiDAC] ($n = 41$). Для лечения 10 пациентов со множественными сопутствующими заболеваниями использовалась программа сниженной интенсивности «азацитидин + венетоклакс». В дальнейшем проведен анализ взаимосвязи экспрессии CD200 с частотой достижения полной ремиссии (ПР) после 1-го цикла противоопухолевой терапии, частотой развития ранних рецидивов (РР) и общей выживаемостью (ОВ). 23 пациентам выполнена трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК).

Результаты. Медиана экспрессии CD200 составила 58,8 % (диапазон 0–100 %). Положительными считались образцы с экспрессией более 20 %. Пациенты были разделены на положительную и отрицательную группы в зависимости от экспрессии CD200, который был положительным у 33 (60 %) из 51 пациента. Различий между группами по таким параметрам, как пол, возраст, количество лейкоцитов и бластных клеток костного мозга, не было. Наиболее часто выявлялись мутации в генах *IDH1/2*, *ASXL1*, *NPM1*, *FLT3* и *DNMT3A*. Мутация в гене *NPM1* встречалась значительно чаще в CD200-негативной группе, чем в CD200-позитивной (33,3 vs 3,0 %; $p = 0,003$). У пациентов с CD200+ вероятность достижения ПР после первой линии индукционной терапии была значительно ниже и составила 15/33 (45,5 %) vs 14/17 (82 %) в CD200-негативной группе ($p = 0,01$). Частота РР в CD200-позитивной группе была выше, чем в CD200-негативной (69 vs 33 %; $p = 0,025$) (рис. 1). У пациентов, получавших только противоопухолевое лечение, медиана ОВ составила 7,6 мес. в CD200-позитивной группе и не была достигнута в CD200-негативной ($p = 0,039$) (рис. 2).

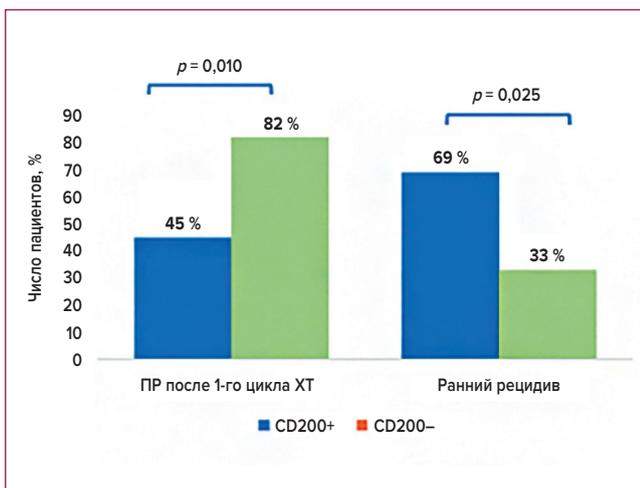


Рис. 1. Влияние экспрессии CD200 на частоту ПР и ранних рецидивов
ПР — полная ремиссия; ХТ — химиотерапия.

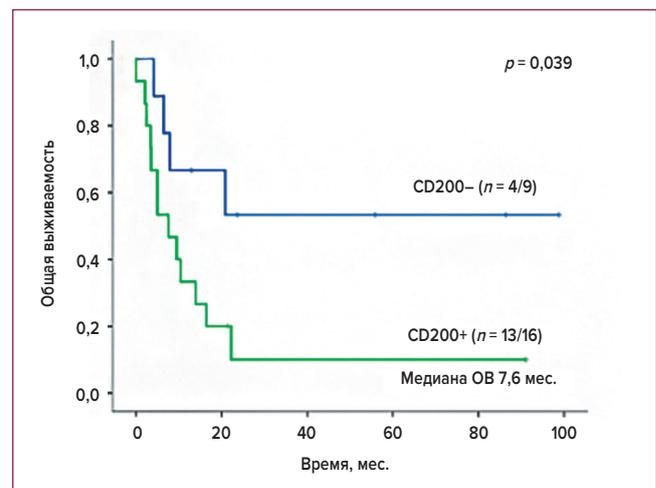


Рис. 2. Влияние экспрессии CD200 на общую выживаемость (ОВ) пациентов, которым не выполнялась аллоТГСК

Заключение. Экспрессия CD200 на бластных клетках при ОМЛ служит фактором неблагоприятного прогноза, оказывающим влияние на частоту достижения ремиссии после 1-го курса химиотерапии и долгосрочную выживаемость пациентов, получающих только противоопухолевое лечение. АллоТГСК может позволить преодолеть негативное влияние экспрессии CD200. Данные исследования MD Anderson Cancer Center, подтверждающие экспрессию CD200 не только на бластных, но и на лейкозных стволовых клетках, позволяют рассматривать этот лиганд как потенциальную мишень для иммунотерапии [2].

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, CD200, иммуносупрессия, прогноз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mendes F, Domingues C, Rodrigues-Santos P, et al. The role of immune system exhaustion on cancer cell escape and anti-tumor immune induction after irradiation. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1865(2):168–75. doi: 10.1016/j.bbcan.2016.02.002.
2. Herbrich S, Baran N, Cai T, et al. Overexpression of CD200 is a Stem Cell-Specific Mechanism of Immune Evasion in AML. *J Immunother Cancer*. 2021;9(7):e002968. doi: 10.1136/jitc-2021-002968.

Измененная форма Flt3-лиганда в составе безантительного Flt3m-CAR и ее роль в таргетировании рецептора Flt3 на поверхности опухолевых клеток в модели *in vitro* острого миелоидного лейкоза

**В.Е. Майорова*, М.Д. Моллаев, П.Н. Вихрева,
А.В. Кибардин, М.А. Масчан, С.С. Ларин**

ФГБУ «НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России,
ул. Саморы Машела, д. 1, Москва, Российская Федерация, 117997

* **Контакты:** Варвара Евгеньевна Майорова, maiorova.varvara@yandex.ru

A Modified Form of Flt3-Ligand Within Antibody-Free Flt3m-CAR Enables Flt3 Receptor Targeting on the Tumor Cell Surface in the *In Vitro* Model of Acute Myeloid Leukemia

VE Maiorova, MD Mollae, PN Vikhрева, AV Kibardin, MA Maschan, SS Larin*

Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology,
1 Samory Mashela ul., Moscow, Russian Federation, 117997

* **Correspondence:** Varvara Evgenyevna Maiorova, maiorova.varvara@yandex.ru

Введение. Современные подходы к терапии опухолевых заболеваний включают применение клеточных препаратов, содержащих химерные антигенные рецепторы (CAR). При таргетировании рецепторов факторов роста перспективным подходом к дизайну новых генетических конструкций, кодирующих CAR, является использование последовательности естественного лиганда к рецептору в качестве внеклеточного узнающего домена CAR. Так можно добиться необходимого узнавания молекулы-мишени, значительно ускорив разработку конструкций CAR, специфичных к новым антигенам-рецепторам факторов роста.

Молекулярной мишенью выбрана тирозинкиназа Flt3 как маркер неблагоприятного прогноза при остром миелоидном лейкозе. Ранее мы показали,

что Flt3-CAR Т-клетки, содержащие полноразмерную последовательность Flt3-лиганда в качестве узнающей части рецептора Flt3-CAR, специфически его таргетируют [1]. Однако Flt3-CAR Т-клетки могут активировать Flt3-обусловленную пролиферацию клеток-мишеней. Известно, что Flt3-лиганд с заменой L27P слабее активировал рецептор Flt3 по сравнению с Flt3-лигандом дикого типа [2]. Таргетировать Flt3 с использованием последовательности лиганда Flt3-L27P может быть безопаснее, т. к. с меньшей вероятностью может происходить Flt3-CAR-опосредованная активация бластных клеток.

Цель. Сравнить специфическую биологическую активность Flt3-лиганда дикого типа и Flt3-L27P-ли-

ганда, а также получить и протестировать Flt3m-CAR Т-клетки с использованием последовательности лиганда Flt3-L27P в качестве узнающей части Flt3m-CAR.

Материалы и методы. Биоактивность лиганда Flt3-L27P оценивалась путем определения ED₅₀ на модели стимулированной пролиферации клеток ТНР-1. Конструкция Flt3m-CAR получена методом сайт-направленного мутагенеза и упакована в лентивирусные частицы. Цитотоксичность Flt3m-CAR Т-клеток изучалась с использованием системы прижизненного наблюдения IncuCyte S3 Live-Cell Imagine System.

Результаты. Показано, что Flt3-L27P-лиганд в концентрации 2 нг/мл не стимулировал уход Flt3-рецептора с поверхности клеток ТНР-1 в отличие от Flt3-лиганда дикого типа. Введение мутации L27P в последовательность Flt3-лиганда конструкции Flt3m-CAR не нарушало специфичность узнавания Flt3m-CAR Т-клетками молекулы-мишени Flt3. Избыток рекомбинантного Flt3-лиганда дикого типа

ингибировал цитотоксические свойства Flt3m-CAR Т-клеток в отличие от лиганда Flt3-L27P.

Заключение. Получены Flt3m-CAR Т-клетки, содержащие в качестве узнающего домена Flt3m-CAR последовательность лиганда Flt3-L27P и специфически определяющие Flt3 в модели *in vitro* острого миелоидного лейкоза. Flt3m-CAR Т-клетки с меньшей вероятностью будут активировать Flt3 в опухолевых клетках или стимулировать уход Flt3 с поверхности клеток-мишеней.

Ключевые слова: безантительные CAR Т-клетки, острый миелоидный лейкоз, Flt3, лиганд Flt3-L27P.

ЛИТЕРАТУРА

1. Maiorova V, Mollaev MD, Vikhreva P, et al. Natural Flt3Lg-Based Chimeric Antigen Receptor (Flt3-CAR) T Cells Successfully Target Flt3 on AML Cell Lines. *Vaccines*. 2021;9(11):1238. doi: 10.3390/vaccines9111238.
2. Graddis TJ, Brasel K, Friend D, et al. Structure-Function Analysis of FLT3 Ligand-FLT3 Receptor Interactions Using a Rapid Functional Screen. *J Biol Chem*. 1998;273(28):17626–33. doi: 10.1074/jbc.273.28.17626.

Иновационная система доставки гранзима В в опухолевые клетки

**В.А. Мисюрин¹, И.В. Ярош^{1,2,*}, А.А. Рудакова¹, Н.А. Лыжко¹,
А.Р. Газизова³, М.В. Дмитриева¹, А.А. Бармашов¹, Н.В. Голубцова¹,
М.А. Барышникова¹, И.И. Краснюк²**

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

² ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет) Минздрава России, ул. Большая Пироговская, д. 2, стр. 4, Москва, Российская Федерация, 119435

³ ООО «Генотехнология», ул. 800-летия Москвы, д. 11, корп. 6, Москва, Российская Федерация, 127591

* **Контакты:** Илья Валерьевич Ярош, ilya96yarosh@gmail.com

Innovative System of Granzyme B Delivery to Tumor Cells

**VA Misyurin¹, IV Yarosh^{1,2,*}, AA Rudakova¹, NA Lyzhko¹, AR Gazizova³, MV Dmitrieva¹,
AA Barmashov¹, NV Golubtsova¹, MA Baryshnikova¹, II Krasnyuk²**

¹ NN Blokhin National Medical Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

² IM Sechenov First Moscow State Medical University, 2 korp. 4 Bolshaya Pirogovskaya ul., Moscow, Russian Federation, 119435

³ GenoTehnologiya, 11 korp. 6, 800-letiya Moskvyy ul., Moscow, Russian Federation, 127591

* **Correspondence:** Ilya Valerevich Yarosh, ilya96yarosh@gmail.com

Введение. В настоящее время Т-клетки с химерными антигенными рецепторами (CAR) завоевывают рынок противоопухолевых вакцин. При несомненной эффективности CAR Т-клетки обладают рядом неустраняемых недостатков. В числе этих недостатков высокая стоимость, длительный срок производства и очень короткий срок хранения, необходимость транспортировки в жидком азоте и высокий риск побочных эффектов во время применения. Необходимо отметить, что для выполнения своих функций CAR Т-клетки используют протеазу гранзим В (ГрВ). ГрВ является мощнейшим белком-инициатором каспазного каскада и запуска апоптоза в клетке, в т. ч. в опухолевой. Благодаря этому ГрВ сам по себе может использоваться как противоопухолевое средство.

Цель. Разработать контейнеры для доставки ГрВ и других протеолитических белков в опухолевую клетку.

Материалы и методы. В исследовании использовались мышинный ГрВ и трипсин, который имеет значительно меньшую стоимость по сравнению с ГрВ. Эти белки были нагружены в липосомы по протоколу Bangham [1]. Липосомы, содержащие трипсин, были добавлены в культуральную среду с клетками меланомы mel Kog и A875, клетками рака молочной железы SK-BR-3. Цитотоксический тест проводился методом МТТ. Для статистического анализа использовался критерий Уилкоксона.

Результаты. Эффективность включения ГрВ и трипсина в липосомы была более 90 %. Размер по-

лученных липосом составлял 270–320 нм. Клетки линий mel Kog, A875 и SK-BR-3 погибали в присутствии липосом с трипсином ($p < 0,01$ для всех линий). Цитотоксичность 0,05 мг/мл липосомального трипсина составила 22 % на линии mel Kog, 10 % на линии A875 и 9 % на линии SK-BR-3. Наблюдалось дозозависимое снижение цитотоксичности липосомального трипсина. IC_{50} определить не удалось, т. к. не наблюдалось гибели 50 % клеток. Ввиду малого количества ГрВ мыши цитотоксичность его липосомальной формы была исследована только на линии mel Kog, которая показала цитотоксическую реакцию на уровне 10 % при концентрации ГрВ 25 пг/мл. При уменьшении концентрации липосомального ГрВ цитотоксичность также снижалась ($p = 0,0325$).

Заключение. Эксперименты показали возможность включения протеолитических белков в состав липосомы. Полученные липосомы обладали цитотоксической активностью против опухолевых линий. В будущем планируется использовать большую концентрацию ГрВ для определения IC_{50} его липосомальной формы.

Ключевые слова: гранзим В, трипсин, липосомы, меланома, цитотоксичность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Meure LA, Foster NR, Dehghani F. Conventional and Dense Gas Techniques for the Production of Liposomes: A Review. AAPS PharmSciTech. 2008;9(3):798–809. doi: 10.1208/s12249-008-9097-x.

Разработка и тестирование новых CAR Т-клеточных продуктов в онкогематологии

Т.Н. Беловежец^{1,}, С.В. Кулемзин^{1,2}, А.А. Горчаков^{1,2}*

¹ ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН», Академика Лаврентьева пр-т, д. 8/2, Новосибирск, Российская Федерация, 630090

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

* **Контакты:** Татьяна Николаевна Беловежец, belovezhec@mcb.nsc.ru

Development and Testing of New CAR-T Products in Oncohematology

TN Belovezhets^{1,}, SV Kulemzin^{1,2}, AA Gorchakov^{1,2}*

¹ Institute of Molecular and Cell Biology, 8/2 Akademika Lavrenteva pr-t, Novosibirsk, Russian Federation, 630090

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

* **Correspondence:** Tatyana Nikolaevna Belovezhets, belovezhec@mcb.nsc.ru

Введение. Несмотря на успех одобренных FDA (Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США) и появление новых клинических исследований альтернативных Т-клеточных продуктов с химерным антигенным рецептором (CAR), нельзя сказать, что такая терапия вызывает полный ответ и долгосрочную бессобытийную выживаемость у всех пациентов. В настоящее время становится очевидно, что значимая доля рецидивов — это CD19-негативные случаи [1, 2], связанные с ускользанием опухолевых клеток из-под контроля CAR-T. У таких пациентов необходимо применение альтернативных вариантов терапии, специфичной к другим В-клеточным мишеням, или использование би-специфических CAR, одновременно распознающих два или более антигена [3–5].

Цель. Создание и сравнение активности двух вариантов CAR Т-клеток двойной специфичности (CD19-CD20) — биспецифического и бицистронного вариантов — с моноспецифическими вариантами.

Материалы и методы. Были сконструированы лентивирусные плазмиды, кодирующие CAR с антигенраспознающими доменами от антител 2F2 (анти-CD20) и FMC63 (анти-CD19) в двух вариантах: биспецифическом (scFv соединены через гибкий линкер в одной полипептидной цепочке) и бицистронном (два отдельных рецептора находятся под контролем общего промотора и соединены через P2A). С использованием псевдотипированных лентивирусных частиц на основе данных плазмид и Т-клеток здорового донора были получены целевые CAR Т-клеточные продукты. Проводился анализ их поверхностной экспрессии CAR, скорости пролиферации, а также фенотипирование и оценка цитотоксичности против опухолевых клеток-мишеней.

Результаты. Получены Т-клетки здорового донора, экспрессирующие различные варианты CAR двойной специфичности (CD19-CD20): биспецифический и бицистронный. Выявлены достаточный уровень экспрессии CAR на поверхности клеток и специфическое связывание целевых антигенов каждым из антигенраспознающих модулей. Кроме того, показана

специфическая цитотоксичность CAR Т-клеток против клеток-мишеней CD20+CD19+ на уровне, сравнимом с моноспецифическими CAR на основе антител FMC63 и 2F2. Изучен субпопуляционный состав полученных CAR Т-клеточных продуктов, поскольку известно, что коммитированные CAR Т-клетки хуже персистируют в организме [6, 7].

Заключение. Используемая нами методика позволяет получать популяцию CAR Т-клеток с высоким уровнем экспрессии CAR, которые способны перенаправлять цитотоксическую активность Т-клеток на опухолевые антигены, причем каждый модуль в составе CAR является функциональным. Разработка CAR двойной специфичности представляется актуальной задачей, поскольку такой вариант может обеспечить более полный контроль над опухолью, а также помочь пациентам с исходно гетерогенными опухолями.

Ключевые слова: CAR Т-клеточная терапия, онкогематологические заболевания, CD19-негативные рецидивы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gardner R, Wu D, Cherian S, Fang M, et al. Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood*. 2016;127(20):2406–10. doi: 10.1182/blood-2015-08-665547.
2. Pan J, Tan Y, Deng B, et al. Frequent occurrence of CD19-negative relapse after CD19 CAR T and consolidation therapy in 14 TP53-mutated r/r B-ALL children. *Leukemia*. 2020;34(12):3382–7. doi: 10.1038/s41375-020-0831-z.
3. Zah E, Lin MY, Silva-Benedict A, et al. T cells expressing CD19/CD20 bispecific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant B cells. *Cancer Immunol Res*. 2016;4(6):498–508. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0231.
4. Martyniszyn A, Krahl AC, Andre MC, et al. CD20-CD19 bispecific CAR T cells for the treatment of B-cell malignancies. *Hum Gene Ther*. 2017;28(12):1147–57. doi: 10.1089/hum.2017.126.
5. Shah NN, Johnson BD, Schneider D, et al. Bispecific anti-CD20, anti-CD19 CAR T cells for relapsed B cell malignancies: a phase 1 dose escalation and expansion trial. *Nat Med*. 2020;26(10):1569–75. doi: 10.1038/s41591-020-1081-3.
6. Xu XJ, Song DG, Poussin M, et al. Multiparameter comparative analysis reveals differential impacts of various cytokines on CART cell phenotype and function ex vivo and in vivo. *Oncotarget*. 2016;7(50):82354–68. doi: 10.18632/oncotarget.10510.
7. Viaud S, Ma JS, Hardy IR, et al. Switchable control over in vivo CAR T expansion, B cell depletion, and induction of memory. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018;115(46):E10898–E10906. doi: 10.1073/pnas.1810060115.

Функциональное исследование CAR Т-лимфоцитов против мишеней CD87, PD-L-1/2 и лигандов активационного рецептора NKG2D для оценки возможности их применения при злокачественных новообразованиях

К.А. Левчук*, Я.Г. Торопова, А.А. Шатилова,
Л.Л. Гиршова, Е.Г. Ломаиа, А.В. Петухов

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

* **Контакты:** Ксения Александровна Левчук, levchuk_ka@almazovcentre.ru

Functional Study of CAR-T Lymphocytes Specific to CD87 and PD-L-1/2 Targets as well as to the Ligands of NKG2D Activation Receptor for Assessing Their Therapeutic Potential in Malignancies

KA Levchuk*, YaG Toropova, AA Shatilova, LL Girshova, EG Lomaia, AV Petukhov

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

* **Correspondence:** Kseniya Aleksandrovna Levchuk, levchuk_ka@almazovcentre.ru

Введение. Адоптивная Т-клеточная терапия с химерным антигенным рецептором (CAR) в настоящее время представляет инновационное активно развивающееся направление иммунотерапии онкологических заболеваний, которое возникло из первоначальной концепции о специфичности рецепторов опухоль-ассоциированных Т-лимфоцитов [1]. Совокупность многочисленных мировых клинических исследований и научно-исследовательских разработок способствует накоплению опыта и значительному прогрессу в данной сфере. Эффективность адоптивного CAR Т-клеточного трансфера, в частности, в области онкогематологии позволило к 2023 г. официально получить регистрацию FDA (Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США) 6 биомедицинских продуктов CAR Т-лимфоцитов для лечения множественной миеломы и различных В-клеточных лимфом [2].

В настоящее время эффективная элиминация опухолей эпителиального происхождения находится на этапе оптимизации специфичности рецептора, предотвращения серьезных побочных эффектов и интенсивных поисков опухоль-специфических неоантигенов. Имеющиеся CAR нового поколения в виде адаптерных, тандемных молекул и других логических комбинаций, самоэлиминирующихся конструкций и активирующих switch-рецепторов, способствуют значительному уменьшению опухолевого ускользания и усилению иммунного ответа [3].

Многогранность ингибиторных молекулярных механизмов реактивного опухолевого микроокружения формирует устойчивую резистентность солид-

ных опухолей к терапии и невозможность достичь полной ремиссии у пациентов с аденокарциномами. Паттерн экспрессии мембранных маркеров CD87, PD-L-1/2 и лигандов активационного рецептора NKG2D различен для опухолей эпителиального происхождения, при этом отмечается регуляция экспрессии каждого из них [4–6]. CAR Т-терапия, потенциально направленная на мультитаргетное распознавание и элиминацию резидентов реактивного опухолевого микроокружения, может стать инновационным инструментом против рецидивирующих злокачественных опухолей.

Цель. Оценка эффективности многокомпонентного препарата CAR Т-лимфоцитов, специфичных к нескольким мишеням реактивного опухолевого микроокружения.

Материалы и методы. Дизайн и конструкции последовательностей химерных антигенных рецепторов NKG2D и PD-1 были разработаны и получены на базе ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ с помощью молекулярного клонирования в экспрессионные плазмидные векторы с конститутивным промотором EF-1. Последовательности CAR к маркерам CD87 и CD19 (FMC63) созданы с помощью синтеза *de novo* в компании «Евроген» (Россия). Популяции CAR Т-лимфоцитов получены путем модификации Т-лимфоцитов здорового донора с помощью лентивирусной трансдукции целевых конструкций CAR. Долю CAR Т-лимфоцитов оценивали методом проточной цитометрии. Уровень экспрессии лиган-

дов рецепторов CD87, NKG2D и PD-1 определяли с помощью проточной цитофлуориметрии и количественной ПЦР. Исследование иммунного терапевтического эффекта NKG2D CAR Т-лимфоцитов осуществляли с помощью «стресс-теста» на линии мышей с глубоким иммунодефицитом NSG-SGM3. Уровень инфильтрации CAR Т-лимфоцитов определяли путем иммуногистохимического окрашивания по маркерам CD3, CD4, CD8 парафиновых срезов опухолевых ксенографтов мышей. Специфическую цитотоксическую активность исследуемых популяций CAR Т-лимфоцитов *in vitro* оценивали с помощью системы RTCA xCelligence DP (ACEA Biosciences, США), уровень ключевых провоспалительных цитокинов — методом ИФА (иммуноферментный анализ) или цитофлуориметрически с применением Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD, США).

Результаты. Получены конструкции экспрессионных плазмидных векторов NKG2D CAR, PD-1 CAR, CD87 CAR. Специфичность популяций CAR Т-лимфоцитов NKG2D, PD-1 и CD87 верифицирована с помощью аналитических экспериментов *in vitro*, доказывающих элиминацию лиганд-экспрессирующей опухолевой мишени и одновременный синтез цитокинов воспаления. Средняя масса опухолевых ксенографтов в группе мышей после инъекции CAR Т-лимфоцитов CD19 была сниженной по сравнению с группой введения CAR Т-лимфоцитов NKG2D и Т-клеток ($p < 0,05$). Показана гетерогенность линий аденокарцином HeLa, Caco-2, SW837, HepG2, A431, H460, T-47D по экспрессионным уровням лигандов активационного рецептора NKG2D, PD-L1/2, CD87. Линии исследуемых аденокарцином, экспрессирующих искусственно внедренный антиген CD19, характеризуются разным уровнем цитолиза специфическими CAR Т-лимфоцитами CD19 при показателе Е/Т (соотношение эффекторов/опухоли), равном

1:1. Для дальнейшего моделирования *in vitro* реактивного опухолевого микроокружения планируется получить фракцию микровезикул, содержащих PD-L1. Оценка эффективности и преимущества многокомпонентного препарата CAR Т-лимфоцитов будет проведена с использованием выбранной линии аденокарциномы, микровезикулярной фракции PD-L1 и линии миелоидных супрессоров NB4 как комбинации моделирующих реактивное опухолевое микроокружение.

Заключение. Потенциал использования многокомпонентного биомедицинского продукта CAR Т-лимфоцитов в онкологии остается до сих пор не исследованным. В настоящей работе оценивается новый подход в адоптивной CAR Т-иммунотерапии, открывающий инновационные перспективы в терапии злокачественных новообразований.

Ключевые слова: адоптивная терапия CAR Т-лимфоцитами, реактивное опухолевое микроокружение, мультитаргетный клеточный препарат.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rosenberg SA. A Journey in Science : Immersion in the search for effective cancer immunotherapies. *Mol Med.* 2021;27(1):63. doi: 10.1186/s10020-021-00321-3.
2. Zhang X, Zhu L, Zhang H, et al. CAR-T Cell Therapy in Hematological Malignancies: Current Opportunities and Challenges. *Front Immunol.* 2022;13:927153. doi: 10.3389/fimmu.2022.927153.
3. De Bousser E, Callewaert N, Festjens N. T cell engaging immunotherapies, highlighting chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy. *Cancers.* 2021;13(23):1–36. doi: 10.3390/cancers13236067.
4. Duan S, Guo W, Xu Z, et al. Natural killer group 2D receptor and its ligands in cancer immune escape. *Mol Cancer.* 2019;18(1):29. doi: 10.1186/s12943-019-0956-8.
5. Alfano D, Franco P, Stoppelli MP. Modulation of Cellular Function by the Urokinase Receptor Signalling: A Mechanistic View. *Front Cell Devel Biol.* 2022;10:818616. doi: 10.3389/fcell.2022.818616.
6. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep.* 2017;19(6):1189–201. doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.031.

Оригинальный протокол производства CAR T-клеточных продуктов на основе одновременной активации и селекции T-лимфоцитов с использованием биспецифических антител

И.Н. Гапоненко, А.А. Потанин, В.В. Маркелов, Д.А. Сеничкина,
В.С. Сергеев, А.И. Шакирова, К.В. Лепик, А.Д. Кулагин*

НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой,
ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»
Минздрава России, ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022

* **Контакты:** Иван Николаевич Гапоненко, ivangaponenko1999@mail.ru

An Original Protocol for the Generation of CAR-T Products Based on Simultaneous Activation and Selection of T-Lymphocytes Using Bispecific Antibodies

IN Gaponenko, AA Potanin, VV Markelov, DA Senichkina, VS Sergeev, AI Shakirova, KV Lepik, AD Kulagin*

RM Gorbacheva Scientific Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation; IP Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 6/8 L'va Tolstogo ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 197022

* **Correspondence:** Ivan Nikolaevich Gaponenko, ivangaponenko1999@mail.ru

Введение. Терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR) является многообещающей опцией для лечения В-клеточных злокачественных новообразований. Важные этапы производства CAR Т-продукта — активация и экспансия Т-клеток. Основные варианты протокола включают активацию селектированных CD4⁺/CD8⁺ лимфоцитов CD3/CD28 специфическими частицами-активаторами или же активацию неселектированных мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) с помощью моноклональных анти-CD3-антител. Последний способ более экономичный, однако применение полученных таким образом продуктов ограничено в отношении заболеваний, для которых характерно наличие циркулирующих опухолевых В-клеток. Мы предлагаем использовать моноклональные биспецифические антитела для одновременной активации Т-клеток и элиминации популяции В-клеток в процессе производства CAR-T.

Цель. Исследовать возможность применения анти-CD3/CD20-антитела для одновременной активации Т-лимфоцитов и элиминации В-лимфоцитов.

Материалы и методы. МКПК 7 здоровых доноров выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности фикола или иммуномагнитной селекции по Т-клеточному рецептору α/β и CD19. Клетки были засеяны в 24-луночный планшет в концентрации 1×10^6 /мл. Для активации использовалось анти-CD3/CD20-антитело в 4 различных концентрациях (1, 5, 10 и 20 пмоль/мл соответственно) с добавлением

150 МЕ/мл интерлейкина-2 в течение 6 дней. В качестве отрицательного контроля клетки культивировались в среде без добавления активирующего агента в течение 6 дней; в группе сравнения активация проводилась с помощью ОКТ-3 в концентрации 100 нг/мл или анти-CD3/CD28-антител. Для оценки кинетики пролиферации МКПК использовали кумулятивный уровень удвоения популяций (КУУП). После выделения и на 3-й день после активации содержание CD3⁺, CD19⁺, CD4, CD45RO, CCR7 оценивалось путем проточной цитофлуориметрии. На основе указанных маркеров среди CD4 и CD8 выделены 4 группы: клетки центральной памяти (ТСМ), наивные Т-лимфоциты/стволовые клетки памяти, эффекторные лимфоциты (EFF) и клетки эффекторной памяти (ТЕМ). На 3-й день проводилась трансдукция анти-CD19 CAR при МОИ 3 (множественность заражения), концентрации протамина сульфата 10 мкг/мл со спинокуляцией.

Результаты. Во всех экспериментах наблюдалась активация Т-клеток с выраженной экспансией к 6-му дню. КУУП статистически значимо отличался во всех экспериментальных группах в сравнении с группой контроля ($p < 0,05$), а также в группах с добавлением анти-CD3/CD20-антитела в сравнении с контрольными группами. В день 0 число клеток CD19⁺ в МКПК составляло $18,97 \pm 2,87$ и $5,97 \pm 1,05$ % в группах с иммуномагнитной селекцией и без нее соответственно. На 3-й день культивации у всех доноров наблюдалась элиминация В-лимфоцитов, тогда как в контролях с ОКТ-3 и анти-CD3/CD28 их число сохранялось на уровне 1-го дня. При оценке влияния

предложенного протокола активации на иммунофенотип Т-клеток выявлено уменьшение количества $EFF \geq 2$ раз, $TEM \geq 1,5$ раза и увеличение количества $TSM \geq 8$ раз. Уровень трансдукции в исследуемых образцах составил $55,0 \pm 1,4$ % в группе с иммуномагнитной селекцией vs $32,8 \pm 2,6$ % в группе контроля ($p > 0,1$) и $23,2 \pm 2,2$ vs $19,34 \pm 2,1$ % в группе без селекции и группе контроля соответственно ($p > 0,2$).

Заключение. Активация Т-клеток в МКПК посредством добавления во всех указанных концентрациях анти-CD3/CD20-антитела не уступает стандартному протоколу активации и экспансии с ОКТ-3 (ан-

ти-CD3/CD28-антителами). Вместе с элиминацией В-лимфоцитов в популяции Т-лимфоцитов уменьшается количество эффекторных клеток, одновременно возрастает число клеток памяти, что служит благоприятным субпопуляционным профилем Т-клеток для последующего производства CAR-T. Активация с помощью анти-CD3/CD20-антитела, вероятно, не оказывает статистически значимого влияния на последующую трансдукцию.

Ключевые слова: CAR-T, химерный антигенный рецептор, биспецифические антитела, В-клеточные опухоли.

Оптимизация геометрических условий трансдукции Т-клеток с использованием микрофлюидных систем

**В.В. Маркелов^{1*}, К.В. Арабули², И.Н. Гапоненко¹, В.С. Сергеев¹,
Д.А. Сеничкина¹, А.А. Потанин¹, В.О. Лаушкина¹, М.В. Зюзин²,
А.И. Шакирова¹, К.В. Лепик¹, А.Д. Кулагин¹**

¹ НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022

² ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО», Кронверкский пр-т, д. 49, лит. А, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197101

* **Контакты:** Владислав Витальевич Маркелов, marckelov.vladislav5@mail.ru

Optimization of Geometric Conditions of T-Cell Transduction Using Microfluidic Systems

**VV Markelov^{1*}, KV Arabuli², IN Gaponenko¹, VS Sergeev¹, DA Senichkina¹, AA Potanin¹,
VO Laushkina¹, MV Zyuzin², AI Shakirova¹, KV Lepik¹, AD Kulagin¹**

¹ RM Gorbacheva Scientific Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation; IP Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 6/8 L'va Tolstogo ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 197022

² ITMO National Research University, 49 lit. A Kronverkskii pr-t, Saint Petersburg, Russian Federation, 197101

* **Correspondence:** Vladislav Vitalevich Markelov, marckelov.vladislav5@mail.ru

Введение. В настоящее время высокий уровень трансдукции Т-лимфоцитов может быть достигнут за счет привлечения большого числа ресурсов и/или включения в производственный процесс дополнительных этапов. Известно, что период полураспада вирусного вектора составляет несколько часов. Движение же вирусных частиц опосредуется броуновским движением. По этой причине вероятность кон-

такта вирусного вектора и клеток-мишеней определяется расстоянием между ними. Перспективным представляется направление по модификации геометрических условий проведения трансдукции. Использование микрофлюидных систем, сочетающих в себе большую площадь поверхности и малый объем, обладает потенциалом повышения эффективности трансдукции.

Цель. Изучение оптимизации геометрических условий трансдукции Т-лимфоцитов.

Материалы и методы. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделены из образцов крови здоровых доноров в среде с градиентом плотности фикола. Т-лимфоциты были получены методом иммуномагнитной селекции из МКПК и активированы наночастицами, мечеными анти-CD3/CD28-антителами. В группе контроля 1×10^6 активированных Т-лимфоцитов трансдуцировали при MOI 5 (множественность заражения) по ранее описанному протоколу [1]. В экспериментальных группах трансдукция проводилась в статических условиях в микрофлюидных чипах из полидиметилсилоксана в течение 6, 12, 18 и 24 ч. Площадь поверхности дна чипов составляла 1 см^2 . В чипах трансдукции подвергалось $0,2 \times 10^6$ активированных Т-клеток. Трансдукция в контрольной и экспериментальных группах проходила в среде X-VIVO-15 + 5%-я инактивированная человеческая сыворотка + IL-15/IL-7 + протамина сульфат 10 мкг/мл. После трансдукции Т-лимфоциты культивировались в течение 7 дней в среде X-VIVO-15 + 5%-я человеческая сыворотка + IL-15/IL-7. Проточная цитофлуориметрия выполнялась в Д1 и Д7 после трансдукции. Уровень трансдукции оценивался с помощью флуорохромных анти-FCM63-антител. Результаты представлены как среднее значение со стандартной ошибкой.

Результаты. Выявлена зависимость эффективности трансдукции от длительности инкубации в чипе. Уровень трансдукции в Д1 при инкубации в течение 6 ч составлял $23,7 \pm 8,2 \%$, в течение 12 ч — $41,2 \pm 12,7 \%$, 18 ч — $50,9 \pm 11,1 \%$, 24 ч — $69,2 \pm 4,7 \%$ ($p = 0,028$). Временная точка 24 ч была выбрана как наиболее оптимальная для сравнения с контролем.

Доля живых Т-клеток (7aad-негативных) не отличалась в контрольной и экспериментальной группах и составляла $88,3 \pm 4$ и $85,2 \pm 3,4 \%$ соответственно ($p = 0,610$). Наблюдалось различие в уровне экспансии Т-лимфоцитов в Д7 ($p = 0,024$). При использова-

нии стандартного протокола количество клеток увеличилось в $6,2 \pm 0,33$ раза, в то время как в группе микрофлюидной трансдукции — в $22,4 \pm 1,6$ раза. Изменения в субпопуляционном составе CAR Т-клеток в исследуемых группах носили синхронный характер. Уровень трансдукции в протоколе контроля в Д1 составил $41,7 \pm 8,9 \%$, что было ниже, чем при инкубировании в чипе в течение 24 ч ($p = 0,017$). В Д7, напротив, различия нивелировались: $15,5 \pm 5,7$ и $19,2 \pm 2,9 \%$ соответственно ($p = 0,570$).

Заключение. Время трансдукции в чипе линейно влияло на ее эффективность. Минимальный уровень трансдукции наблюдался при инкубировании в течение 6 ч, максимальный — через 24 ч. Т-лимфоциты, трансдуцированные в чипах, жизнеспособны, способны к пролиферации, а их фенотипический состав не претерпевает значительных изменений в сравнении с контрольной группой. Проведение трансдукции в микрофлюидной системе обеспечивает более эффективное взаимодействие вирусных частиц с Т-лимфоцитами в сравнении с контрольной группой, что находит отражение в высокой доле CAR-экспрессирующих клеток в Д1. Однако в Д7 число CAR-позитивных лимфоцитов снижается, что отчасти объясняется явлением псевдотрансдукции и особенностями используемых образцов лентивирусного вектора. Таким образом, микрофлюидная трансдукция только за счет модификации геометрических условий продемонстрировала сопоставимую с наилучшим протоколом контроля эффективность, что делает ее перспективным и требующим дальнейшего изучения методом.

Ключевые слова: чип, микрофлюидная трансдукция, CAR-T.

ЛИТЕРАТУРА

1. Belovezhets T, Kulemzin S, Volkova O, et al. Comparative Pre-Clinical Analysis of CD20-Specific CAR T Cells Encompassing 1F5-, Leu16-, and 2F2-Based Antigen-Recognition Moieties. *Int J Mol Sci.* 2023;24(4):3698. doi: 10.3390/ijms24043698.

Российские нейтрализующие антитела против SARS-CoV-2 широкого спектра действия

А.В. Таранин*

ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН»,
Академика Лаврентьева пр-т, д. 8/2, Новосибирск, Российская Федерация, 630090

* **Контакты:** Александр Владимирович Таранин, taranin@mcb.nsc.ru

Russian Broadly Neutralizing Anti-SARS-CoV-2 Antibodies

AV Taranin*

Institute of Molecular and Cell Biology, 8/2 Akademika Lavrenteva pr-t,
Novosibirsk, Russian Federation, 630090

* **Correspondence:** Aleksandr Vladimirovich Taranin, taranin@mcb.nsc.ru

Введение. Разработка средств профилактики и терапии новой коронавирусной инфекции на основе нейтрализующих моноклональных SARS-CoV-2-антител (нМКА) была одним из основных направлений противодействия пандемии COVID-19. К концу 2021 г. девять противовирусных нМКА были авторизованы для экстренного применения у пациентов из групп риска. Однако эти антитела оказались неэффективными против новых мутантных вариантов SARS-CoV-2, относящихся к сублинии ХВВ, которая в настоящее время ответственна за более 90 % документируемых случаев коронавирусной инфекции в мире. Распространение резистентных вариантов вируса в отсутствие терапевтических антител представляет особую опасность для лиц с иммунодефицитом различного происхождения, в т. ч. связанного с лечением гематологических заболеваний. Поиск антител, нейтрализующих новые варианты SARS-CoV-2, остается по-прежнему актуальным. Особый интерес представляют антитела широкого спектра действия, которые могли бы противостоять возможным будущим вариантам вируса.

Цель. Изучение новых нейтрализующих наноантител широкого спектра действия.

Материалы и методы. Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН в сотрудничестве с рядом российских научных организаций работает над получением нМКА с начала распространения COVID-19 в России. Первая панель нМКА была получена уже к июлю 2020 г. Четыре нМКА из этой панели отличались сверхвысоким потенциалом и высокой защитной эффективностью против уханьского (Wu-1) варианта вируса *in vivo* на модели сирийских хомячков [1]. В 2022 г. в связи с распространением линии омикрон

была создана новая панель противовирусных нМКА человека. Одно из них, iC1, является антителом широкого спектра действия, нейтрализующим весь спектр вариантов сублинии ХВВ.

Результаты. В экспериментах *in vivo* нМКА iC1 в дозе 10 мг/кг массы тела полностью предотвращало гибель hACE2-гуманизированных мышей, инфицированных вариантами вируса Wu-1, омикрон BA.4/5 и омикрон ХВВ.1.5. В качестве альтернативного направления изучались свойства SARS-CoV-2-специфических нейтрализующих однодоменных антител лампы.

Заключение. В ходе работы выявлены четыре нейтрализующих наноантитела широкого спектра действия против разных эпитопов рецептор-связывающего домена шиповидного белка. Эти наноантитела могут быть использованы для создания би- и олигоспецифических противовирусных агентов нового поколения.

Ключевые слова: COVID-19, терапевтические антитела, варианты SARS-CoV-2, наноантитела.

Источники финансирования: работа поддержана Министерством науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-1086, контракт № РФ-193021X0015, 15.ИП.21.0015).

ЛИТЕРАТУРА

1. Gorchakov AA, Kulemzin SV, Guselnikov SV, et al. Isolation of a panel of ultra-potent human antibodies neutralizing SARS-CoV-2 and viral variants of concern. *Cell Discov.* 2021;7(1):96. doi: 10.1038/s41421-021-00340-8.

Комбинированная терапия глиобластомы с помощью CAR NK-клеточных препаратов и модифицированных онколитических вирусов в эксперименте

Г.М. Юсубалиева^{1,2,3,*}, А.В. Липатова³, М.В. Ширманова⁴, В.П. Баклаушев^{1,2,3}

¹ ФГБУ «ФНКЦ специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России», Ореховый б-р, д. 28, Москва, Российская Федерация, 115682

² ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России», ул. Островитянова, д. 1/10, Москва, Российская Федерация, 117513

³ ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», ул. Вавилова, д. 32, Москва, Российская Федерация, 119991

⁴ ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, пл. Минина и Пожарского, д. 10/1, Нижний Новгород, Российская Федерация, 603005

* **Контакты:** Гаухар Маратовна Юсубалиева, yusubalieva.gm@fnkc-fmba.ru

Combined Therapy of Glioblastoma with CAR-NK Drugs and Modified Oncolytic Viruses in Experiment

GM Yusubalieva^{1,2,3,*}, AV Lipatova³, MV Shirmanova⁴, VP Baklaushev^{1,2,3}

¹ Federal Research Clinical Center for Specialized Health Care and Medical Technologies, 28 Orekhovyi b-r, Moscow, Russian Federation, 115682

² Federal Center for Brain and Neurotechnologies, 1/10 Ostrovityanova ul., Moscow, Russian Federation, 117513

³ VA Engelhardt Institute of Molecular Biology, 32 Vavilova ul., Moscow, Russian Federation, 119991

⁴ Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minina i Pozharskogo pl., Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603005

* **Correspondence:** Gaukhar Maratovna Yusubalieva, yusubalieva.gm@fnkc-fmba.ru

Введение. В настоящее время значимость NK-клеток при глиобластоме всесторонне обсуждается [1]. Поскольку дифференцированные клетки глиобластомы восприимчивы к химиотерапии, комбинацию NK и противоопухолевых лекарственных средств следует рассматривать как потенциальный вариант лечения этой опухоли [2]. Альтернативным подходом в терапии глиобластом является применение NK-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR). В частности, терапия анти-HER2 CAR-NK была изучена в I фазе клинических исследований у пациентов с глиобластомой и показала более высокую инфильтрацию T-клеток CD8+ и стабилизацию заболевания у некоторых участников [3]. Появляются исследования, посвященные модификации NK-клеток, например нокауту гена *CISH* [4], белок которого, как известно, ингибирует восприимчивость NK-клеток к интерлейкину (IL)-15 и, следовательно, его цитотоксическую активность. Кроме того, изучается таргетная терапия NK- и T-клетками путем их совместного переноса с IL-15/IL-15R, секретирующими онколитический вирус, что способствует выживанию иммунных клеток [5].

Цель. Создание схемы универсальной иммунотерапии мультиформной глиобластомы в комбинации с онколитическими вирусами.

Материалы и методы. Проводились работы *in vitro* на опухолевых сфероидсах, полученных из глиобластомы пациентов ФНКЦ ФМБА и ФЦМН ФМБА (протокол ЛЭК № 16 от 30.09.2017 г., № 10 от 6.10.2020 г.), и *in vivo* на сингенных и ксенографтных моделях глиобластомы. В эксперименте оценивали противоопухолевую эффективность модифицированных/таргетированных линейных NK-клеток (VAV1⁺, CISH^{-/-}, B2M^{-/-}, EGFRvIII-CAR, аутологичных TIL-NKT) и вирусную онколитическую активность штаммов осповакцины, экспрессирующих цитокины IL-15 или гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор либо содержащих антигенсвязывающую последовательность одноцепочечных антител к PD-1, которые выключают соответствующую ось ингибиторов иммунных контрольных точек (получены в Институте молекулярной биологии РАН). Для определения клеток-мише-

ней в экспериментах *in vitro* и *in vivo* применяли бидирионные лентивирусные векторы для одновременной экспрессии флуоресцентного белка mKate2 и люциферазы Luc2. Для экспериментов *in vitro* и *in vivo* иммунные клетки метили витальными флуоресцентными трейсерами. Взаимодействие иммунных клеток с опухолевыми в экспериментах *in vitro* и *in vivo* изучали с помощью интравитальной конфокальной микроскопии и метаболического биоимиджинга, FLIM-микроскопии и оптической когерентной томографии. Фенотип привлеченных иммунных клеток на сингенной модели в процессе иммунотерапии и онколитической вирусной терапии оценивали путем прижизненной интравитальной микроскопии через установленное краниальное окно и с помощью проточного цитофлуориметра MACSQuant 10 с лазерами 405, 488 и 635 нм.

Результаты. При микроскопическом исследовании в динамике выявлено, что активированные аутологичные опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL), модифицированные НК-клетки и аллогенные НК способны мигрировать вглубь сфероидов глиобластомы человека, разрушая трехмерную структуру, изменяя экспрессию поверхностных опухолевых маркеров и приводя к метаболическим нарушениям и апоптозу опухолевых клеток. В эксперименте показана таргетная способность модифицированных НК-клеток на ксенографтных моделях, а также онколитическая цитотоксичность модифицированных штаммов осповакцины по отношению к глиомамным клеткам. Получены первичные результаты по комбинированной иммунотерапии в сочетании со штаммом осповакцины, экспрессирующим IL-15.

Заключение. Полученные результаты могут стать основой для разработки новых технологий адоптивной иммунотерапии солидных опухолей, в частности мультиформной глиобластомы, путем повышения таргетности и преодоления иммуносупрессивного микроокружения, а также для создания новых схем комбинированной терапии.

Ключевые слова: адоптивная иммунотерапия, солидные опухоли, NKT, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL), CAR НК-клеточная терапия.

Источники финансирования: исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ № 22-64-00057 и в рамках государственного задания ФМБА России «Глиобластома — TILs».

ЛИТЕРАТУРА

1. Sedgwick AJ, Ghazanfari N, Constantinescu P, et al. The Role of NK Cells and Innate Lymphoid Cells in Brain Cancer. *Front Immunol.* 2020;11:1549. doi: 10.3389/fimmu.2020.01549.
2. Kozłowska AK, Topchyan P, Kaur K, et al. Differentiation by NK cells is a prerequisite for effective targeting of cancer stem cells/poorly differentiated tumors by chemopreventive and chemotherapeutic drugs. *J Cancer.* 2017;8(4):537–54. doi: 10.7150/jca.15989.
3. Burger MC, Forster M-T, Romanski A, et al. Intracranial injection of NK cells engineered with a HER2-targeted chimeric antigen receptor in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2023;25(11):2058–71. doi: 10.1093/neuonc/noad087.
4. Yusubaliev GM, Dashinimaev EB, Gorchakov AA, et al. Enhanced Natural Killers with CISH and B2M Gene Knockouts Reveal Increased Cytotoxicity in Glioblastoma Primary Cultures. *Mol Biol (Mosk).* 2022;56(5):848–59. doi: 10.31857/S0026898422050159.
5. Ma R, Lu T, Li Z, et al. An Oncolytic Virus Expressing IL15/IL15Ra Combined with Off-the-Shelf EGFR-CAR NK Cells Targets Glioblastoma. *Cancer Res.* 2021;81(13):3635–48. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-0035.

Анализ эффективности получения CAR T-лимфоцитов у здоровых доноров и пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями

Д.Ю. Глущенко*, А.А. Оганнисян, Ч.К. Мабудзаде, Г.А. Дудина

ГБУЗ «Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова ДЗМ», ул. Новогиреевская, д. 1, корп. 1, Москва, Российская Федерация, 111123

* **Контакты:** Дмитрий Юрьевич Глущенко, d.glushchenko@mknc.ru

Analysis of CAR-T Lymphocyte Production Efficiency in Healthy Donors and Patients with Lymphoproliferative Diseases

DYu Glushchenko*, AA Ogannisyanyan, ChK Mabudzade, GA Dudina

AS Loginov Moscow Clinical Scientific Center, 1 korp. 1 Novogireevskaya ul., Moscow, Russian Federation, 111123

* **Correspondence:** Dmitrii Yurevich Glushchenko, d.glushchenko@mknc.ru

Цель. Сформировать научно-техническую и лабораторную базу для внутривитального изготовления персонализированных высокотехнологических лекарственных препаратов на основе аутологических генетически модифицированных лимфоцитов. В рамках проекта предлагается локализация протокола получения CD19-специфических Т-лимфоцитов с химерным антигенным рецептором (CAR).

Материалы и методы. В исследовании использовались экспериментальные и лабораторные методы культивирования клеток человека с анализом получаемых популяций лимфоцитов при применении проточной цитометрии, микроскопии, цитологических техник. Применялись базовые биохимические методы для анализа получаемых клеточных продуктов (иммуноферментный анализ, гель-электрофорез, иммуноблоттинг, ПЦР и др.) и контроля качества (определение стерильности, LAL-тест и др.), а также метод лентивирусной трансдукции мононуклеарной фракции клеток периферической крови человека и экспансии анти-CD19 CAR Т-клеток *ex vivo* в питательной среде, содержащей коктейль интерлейкинов.

Результаты. Осуществлено пилотное получение опытных образцов CAR-T у 18 пациентов (16 — с диффузной В-крупноклеточной лимфомой, 2 — с острым лимфобластным лейкозом) и 6 здоровых доноров. Проведены предварительные работы, подтверждающие возможность создания лимфоцитов с CAR для лечения онкогематологических заболеваний, таких как В-клеточный острый лимфобластный лейкоз и CD19-позитивные неходжкинские лимфомы. Разработаны и апробированы в экспериментах *in vitro* генно-инженерные конструкции, кодирующие CD19-специфические химерные рецепторы 2, 3 и 4-го поколений. На различных клеточных моделях (нормальные лимфоциты, стабильные клеточные линии лимфоидного ряда) подтверждена экспрессия рекомбинантных белков, кодируемых данными конструкциями, методом вестерн-блоттинга. Оптимизированы условия получения генетических векторов, позволяющих проводить трансдукцию первичных иммунных Т-клеток с высокой эффективностью и сохранением жизнеспособности при длительном культивировании и экспансии лимфоцитов. Под-

браны условия и среды культивирования, обеспечивающие высокий уровень пролиферации. Эффективность трансдукции в рутинных экспериментах подтверждена экспрессией трансгена и мембранной локализацией белка в 60–90 % первичных Т-клеток, согласно анализу методом проточной цитофлуориметрии. Получены стабильные флуоресцентно меченные мишени, экспрессирующие CD19. Функциональная активность получаемых CAR Т-клеток подтверждена при сокультивировании с CD19-позитивными клеточными мишенями. Разработаны среды и протоколы для криоконсервации Т-лимфоцитов.

Обсуждение. В настоящее время единственным решением в лечении пациентов с рефрактерными формами острого лимфобластного лейкоза и диффузной крупноклеточной лимфомой, резистентными к противоопухолевой терапии, является использование Т-лимфоцитов с химерным антигенным рецептором (CAR-T). Данный подход представляет собой вариант генной терапии *ex vivo*, когда Т-лимфоциты пациента, полученные в ходе афереза, культивируются в условиях лаборатории или биофармацевтического производства, генетически модифицируются с целью экспрессии искусственного CAR и вводятся пациенту для достижения терапевтического эффекта (уничтожения опухолевых клеток *in vivo*). CAR обычно содержит антигенраспознающую последовательность на внешней части мембраны трансдуцированных клеток, специфически узнающую опухолевые антигены, и внутриклеточные сигнальные домены, вызывающие активацию цитотоксических и киллерных функций лимфоцита периферической крови без использования иммуномагнитной сепарации.

Заключение. Учитывая полученные результаты, необходимо продолжить изучение функциональных возможностей аутологических генетически модифицированных лимфоцитов на лабораторных животных в следующем доклиническом этапе проводимого исследования.

Ключевые слова: CAR-T, CD19, диффузная В-крупноклеточная лимфома, острый лимфобластный лейкоз, CD19-специфические химерные рецепторы 2, 3 и 4-го поколений, Т-клетки.