

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-357

**ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
GD2-СПЕЦИФИЧНЫХ CAR T-КЛЕТОК *IN VITRO* И *IN VIVO* *****ANTITUMOR ACTIVITY AND PHENOTYPIC PROPERTIES
OF GD2-SPECIFIC CAR T CELLS *IN VITRO* AND *IN VIVO***

Ю. Г. Филиппова¹, Ю. А. Шевченко¹, М. С. Фишер¹, С. Алрхмун¹, Р. Ю. Перик-Заводский¹,
О. Ю. Перик-Заводская¹, Ю. А. Лопатникова¹, В. В. Курилин¹, М. О. Волынец¹, А. Алсаллум¹,
Е. Л. Завьялов², О. И. Соловьева², Х. Шикү³, А. Н. Силков¹, С. В. Сенников¹

¹Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

²Центр коллективного пользования SPF-виварий ИЦиГ СО РАН, Новосибирск

³Университет Мие, Цу, Япония

J. G. Philippova¹, J. A. Shevchenko¹, M. S. Fisher¹, S. Alrhoun¹, R. Yu. Perik-Zavodskii¹,
O. Yu. Perik-Zavodskaya¹, J. A. Lopatnikova¹, V. V. Kurilin¹, M. O. Volynets¹, A. Alsalloum¹,
E. L. Zavjalov², O. I. Solovjeva², H. Shiku³, A. N. Silkov¹, S. V. Sennikov¹

¹Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk

²Center for Collective Use SPF-vivarium ICG SB RAS, Novosibirsk

³Mie University, Tsu, Japan

✉ airyuka@mail.ru

Аннотация

В данной работе методом ретровирусной трансдукции были получены антиген-специфические Т-клетки, которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), нацеленный на дисialogанглиозид (GD2), и G1TR лиганд (G1TRL). Полученные GD2-специфические CAR Т-клетки демонстрируют противоопухолевую активность и антиген-специфические свойства *in vitro* и *in vivo* в отношении GD2⁺ опухолевых клеточных линий.

Abstract

In this study antigen-specific T cells expressing chimeric antigen receptor (CAR) targeting disialoganglioside (GD2) and G1TR ligand were generated using retroviral transduction. The generated GD2-specific CAR T cells exhibited antitumor activity and antigen-specific properties *in vitro* and *in vivo* against GD2⁺ tumor cell lines.

Адаптивный перенос *ex vivo* генерируемых генно-модифицированных Т-клеток представляет собой перспективный метод иммунотерапии онкологических заболеваний. Особенностью CAR Т-клеток является специфическое нацеливание на поверхностные антигены, а встраиваемый костимулирующий домен CD28 в конструкцию CAR способствует активации клеток при встрече с мишенью без предварительной антигенной презентации [1]. Среди большого разнообразия антигенов молекула GD2 стабильно экспрессируется на клеточной поверхности различных типов опухолевых клеток, при этом экспрессия антигена в основном ограничена злокачественными новообразованиями, что делает эту мишень привлекательной для нацеливания с помощью CAR-рецептора [2].

Противоопухолевый потенциал готового CAR Т-клеточного продукта задействует различные механизмы иммунной системы для усиления защитных функций, однако микроокружение опухоли и приобретение статуса истощения Т-клетками затрудняют терапию солидных образований. В данном исследовании для повышения противоопухолевой эффективности GD2-специфических CAR Т-клеток в ретровирусный вектор дополнительно была встроена последовательность, кодирующая G1TRL. Аутокринное воздействие на G1TR-рецептор CAR Т-клеток с помощью растворимой формы G1TRL может способствовать усилению пролиферации и продукции цитокинов и снижению порога CD28-костимуляции и апоптоза эффекторных CD8⁺ Т-клеток [3, 4].

Целью работы является оценка противоопухолевой активности и фенотипических свойств GD2-специфических CAR Т-клеток, экспрессирующих G1TRL, *in vitro* и *in vivo*.

В данной работе Т-лимфоциты человека, выделенные из периферической крови условно-здоровых доноров, были модифицированы путем трансдукции ретровирусными векторами, кодирующими GD2-специфичный

* Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 21-65-00004).

CAR-рецептор. После трансдукции было проведено транскриптомное профилирование с помощью платформы NanoString и фенотипическое исследование полученных субпопуляций GD2-специфичных CAR T-клеток методом проточной цитометрии. Трансдуцированные клетки совместно культивировались с опухолевыми клетками (линии меланомы: GD2⁺ — SK-MEL-37 и S6; GD2⁻ — V9) для оценки противоопухолевой активности и фенотипа *in vitro* методами проточной цитометрии и измерения содержания лактатдегидрогеназы и продукции цитокинов в кондиционных средах. Противоопухолевая эффективность GD2-специфичных CAR T-клеток *in vivo* оценивалась на мышиных моделях ксенотрансплантата опухолей человека.

В ходе исследования было выявлено, что трансдуцированные T-клетки обладают выраженной антиген-специфической цитотоксичностью против клеток-мишеней и по сравнению с нетрансдуцированными клетками достоверно больше секретируют IFN- γ , растворимую форму sFasL, гранзимы A/B. Популяция GD2-специфичных CAR T-клеток имеет фенотип наивных CD45RA⁺CD62L⁺ клеток, среди которых преобладают цитотоксические CD8⁺CD40L⁺CD69⁻CD107a⁺4-1BB⁺FasL⁺ T-клетки с низкой экспрессией маркеров истощения TIM-3 и PD-1. Транскриптомное профилирование показало, что после трансдукции повышается экспрессия генов (*CD8A*, *CD8B*, *SELL*, *IL7R*, *CD45RA* и *IL2RG*), ассоциированных с дифференцировкой в сторону наивных CD8 T-клеток, и, напротив, снижается экспрессия генов (*CD4*, *FOXP3*, *IL2RA* и *CTLA4-TM*), ассоциированных с дифференцировкой в сторону CD4 T-регуляторных клеток. В модели ксенотрансплантата опухоли человека GD2-специфичные CAR T-клетки демонстрируют стойкий противоопухолевый эффект, который выражается подавлением роста трансплантированной опухоли.

Таким образом, полученные GD2-специфичные CAR T-клетки проявляют антиген-специфические свойства, обладают мощным противоопухолевым потенциалом *in vitro* посредством регулирования цитотоксической оси гранзимов A и B, высвобождения провоспалительных цитокинов и индукции оси апоптоза Fas/FasL, и эффективно подавляют рост опухоли *in vivo*.

Литература

1. Krause A., Guo H. F., Latouche J. B. et al. Antigen-dependent CD28 signaling selectively enhances survival and proliferation in genetically modified activated human primary T lymphocytes // *The Journal of experimental medicine*. 1998. Vol. 188(4). P. 619–626.
2. Philippova J., Shevchenko J., Sennikov S. GD2-targeting therapy: a comparative analysis of approaches and promising directions // *Frontiers in immunology*. 2024. Vol. 15, 1371345.
3. Tian J., Zhang B., Rui K., et al. The Role of GITR/GITRL Interaction in Autoimmune Diseases // *Frontiers in immunology*. 2020. Vol. 11, 588682.
4. Филиппова Ю. Г., Кузнецова М. С., Шевченко Ю. А. и др. Фенотип и эффекторные функции GD2-специфичных CAR-T-клеток *in vitro* // *Иммунология*. 2022. Т. 43(5). С. 525–535.