

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. Филиппова<sup>1</sup>, Ю. А. Шевченко<sup>1</sup>, М. С. Фишер<sup>1</sup>, С. Алрхмун<sup>1</sup>, Р. Ю. Перик-Заводский<sup>1</sup>,  
О. Ю. Перик-Заводская<sup>1</sup>, Ю. А. Лопатникова<sup>1</sup>, В. В. Курилин<sup>1</sup>, М. О. Волынец<sup>1</sup>, А. Алсаллум<sup>1</sup>,  
Е. Л. Завьялов<sup>2</sup>, О. И. Соловьева<sup>2</sup>, Х. Шики<sup>3</sup>, А. Н. Силков<sup>1</sup>, С. В. Сенников<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

<sup>2</sup>Центр коллективного пользования SPF-виварий ИЦиГ СО РАН, Новосибирск

<sup>3</sup>Университет Мие, Цу, Япония

J. G. Philippova<sup>1</sup>, J. A. Shevchenko<sup>1</sup>, M. S. Fisher<sup>1</sup>, S. Alrhoun<sup>1</sup>, R. Yu. Perik-Zavodskii<sup>1</sup>,  
O. Yu. Perik-Zavodskaya<sup>1</sup>, J. A. Lopatnikova<sup>1</sup>, V. V. Kurilin<sup>1</sup>, M. O. Volynets<sup>1</sup>, A. Alsalloum<sup>1</sup>,  
E. L. Zavjalov<sup>2</sup>, O. I. Solovjeva<sup>2</sup>, H. Shiku<sup>3</sup>, A. N. Silkov<sup>1</sup>, S. V. Sennikov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk

<sup>2</sup>Center for Collective Use SPF-vivarium ICG SB RAS, Novosibirsk

<sup>3</sup>Mie 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> — SK-MEL-37 и S6; GD2<sup>-</sup> — 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- $\gamma$ , растворимую форму sFasL, гранзимы A/B. Популяция GD2-специфичных CAR T-клеток имеет фенотип наивных CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> клеток, среди которых преобладают цитотоксические CD8<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup>CD69<sup>-</sup>CD107a<sup>+</sup>4-1BB<sup>+</sup>FasL<sup>+</sup> 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.