

*Абаева Вероника Анатольевна,  
студентка 5 курса  
лечебный факультет  
Северо-Осетинская государственная медицинская академия Министерства  
здравоохранения Российской Федерации  
Россия, г. Владикавказ  
e-mail: abaeva.veronika99@mail.ru*

*Кантемирова Луиза Арислановна  
студентка 5 курса  
лечебный факультет  
Северо-Осетинская государственная медицинская академия Министерства  
здравоохранения Российской Федерации  
Россия, г. Владикавказ*

*Абдуллаев Рустам Мурадович  
студент 5 курса  
лечебный факультет  
Северо-Осетинская государственная медицинская академия Министерства  
здравоохранения Российской Федерации  
Россия, г. Владикавказ*

*Научный руководитель: Кокаев Ромеш Иванович,  
кандидат медицинских наук, доцент,  
Северо-Осетинская государственная медицинская академия Министерства  
здравоохранения Российской Федерации  
Россия, г. Владикавказ*

## **ПРОЦЕСС СОЗДАНИЯ CAR-T ЛИМФОЦИТОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ЛЕЧЕНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

*Аннотация:* В статье представлены методы создания и способы культивирования CAR-T лимфоцитов, используемых в лечении разных видов онкологических заболеваний. Несмотря на преимущества адоптивной иммунотерапии T-клетками, существует вероятность развития нежелательных эффектов от проводимого лечения, в связи с чем необходимы новые методы модификаций, которые помогут улучшить качество терапии и снизить количество побочных эффектов.

**Ключевые слова:** CAR-T, лимфоциты, адоптивная иммунотерапия, онкология.

*Abaeva Veronika Anatolyevna*

*5th year student  
Medical Faculty  
North Ossetian State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian  
Federation  
Russia, Vladikavkaz,*

*Kantemirova Luiza Arislanovna  
5th year student  
Medical Faculty  
North Ossetian State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian  
Federation  
Russia, Vladikavkaz,*

*Abdullaev Rustam Muradovich  
5th year student  
Medical Faculty  
North Ossetian State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian  
Federation  
Russia, Vladikavkaz,*

*Scientific adviser Kokaev Romesh Ivanovich,  
candidate of medical sciences, associate professor,  
North Ossetian State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian  
Federation  
Russia, Vladikavkaz*

## **THE PROCESS OF CREATION OF CAR-T LYMCOCITES AND THEIR APPLICATION IN THE TREATMENT OF ONCOLOGICAL DISEASES**

***Abstract:** The article presents methods for creating and culturing CAR-T lymphocytes used in the treatment of various types of cancer. Despite the advantages of adoptive T-cell immunotherapy, there is a potential for undesirable effects from the treatment, and therefore new modification methods are needed to help improve the quality of therapy and reduce the number of side effects.*

**Key words:** CAR-T, lymphocytes, adoptive immunotherapy, oncology.

Онкологические заболевания, несмотря на успехи в лечении и диагностике, по смертности занимают 2-е место после болезней сердечно-сосудистой системы. [1] Эффективность стандартных алгоритмов лечения, включая химиотерапию, хирургию, лучевую терапию, остаётся минимальной. Одним из перспективных направлений в современной онкологии является

иммунотерапия, которая стала прорывным направлением в лечении ряда гематологических опухолей.

Концепция иммунологического контроля опухолей впервые была сформирована П. Эрлихом еще в 1909 году, развивалась Ф. Бёрнетом, Л. Томасом. В. Коли использовал неспецифическую стимуляцию иммунной системы для терапии сарком. Однако к началу 90-х годов интерес к иммунотерапии у ученых угас, так как клеточная терапия на тот момент представляла собой незначительные попытки применения лимфокинактивированных киллеров (LAK) и инфильтрирующих опухоль лимфоцитов. Эффективность этой терапии ограничивалась узким спектром опухолей у незначительного количества больных. Кроме того, введенные цитокины вызывали серьезные побочные эффекты. К концу 90-х годов появилась таргетная терапия, которая представляла собой применение ритуксимаба [2], после чего началась работа по получению моноклональных антител (монАТ). На сегодняшний день терапевтических монАТ, специфичных к опухолевым антигенам, разрешено около 20 препаратов против 14 мишеней. Однако и эта терапия имеет недостатки: монАТ сами по себе в большинстве случаев не убивают злокачественную клетку, а маскируют её. Когда АТ связываются с опухолевыми клетками, активируется система комплемента и собственные иммунокомпетентные клетки пациента, что и приводит к уничтожению опухоли [3]. Из этого следует, что иммуносупрессия и истощение цитотоксических клеток может значительно снизить эффективность терапии с использованием антител.

Позже таргетная терапия была объединена с эффекторной клеткой, вследствие чего появилась adoptивная иммунотерапия Т-клетками, которые экспрессировали химерный антигенный рецептор (chimeric antigen receptor – (CAR-T). В 1989 году израильский иммунолог Зелиг Эшхар создал первый в истории химерный рецептор на Т-лимфоцитах, получивших название CAR-T, лимфоциты с усиленным противораковым действием.

CAR-T имеют на поверхности встроенную генетическую конструкция – химерный антигенный рецептор, состоящих из конгломератов белков. Одна из

его частей — домены тяжелой и лёгкой цепи иммуноглобулинов(scFv), они связываются с цитоплазмой с помощью цепей и трансмембранных доменов, распознает раковую клетку и связывается с ней, а другая часть отвечает за активацию и регуляцию механизмов, направленных на уничтожение опухолевой клетки. Кроме того, гены, кодирующие scFv получены из В-клеток, а они в свою очередь продуцируют антитела, специфичные к опухолевому антигену. Теперь Т-лимфоцит способен убивать клетку-мишень, либо стимулировать другие иммунные клетки. При помощи Car-t могут реагировать на нативные антигены, расположенные на мембране опухолевой клетки и убивать её. Для усиления эффекта ученые создали уже 3 поколения т-лимфоцитов, которые содержат на себе стимулирующие домены [4].

Основным требованием к мишеням CAR-T, в сравнении с физиологическими Т-лимфоцитами, является экспрессия белка или иного антигена на поверхности злокачественной клетки. Опухолевые антигены можно разделить на группы. Идеальная мишень – это новая белковая последовательность, характерная исключительно для опухолевой линии, например, мутированные варианты эпидермального фактора роста EGFv3 и MUC-1. Наиболее исследованным антигеном-мишенью на сегодняшний день является CD19, который представляет собой линейно-специфичный тканевой антиген, экспрессированный практически на всех этапах дифференцировки В-лимфоцитов, кроме плазматических клеток. CD19 эспрессируется на поверхности опухолевых клеток почти всех В-линейных опухолей. (ОЛЛ, ХЛЛ, В-клеточные неходжкинские лимфомы [5]). Именно с использованием CD19-CAR-Tклеток были получены первые успешные результаты лечения, что позволило перевести технологию в клинические испытания.

#### Применение CAR-T-лимфоцитов.

На сегодняшний день CAR-T клеточная терапия показала себя в лечении острого лимфобластного лейкоза, неходжкинских лимфом, хроническом лимфолейкозе. Это связано с тем, что лимфоциты несут на своей поверхности «линейные антигены», которые в своей экспрессии ограничены лимфоидными

клетками. Кроме лечения гемабластозов существует небольшое количество испытаний с солидными опухолями, где результаты показывают выраженную токсичность при отсутствии значимого терапевтического эффекта. Наиболее успешными являются клинические испытания при лечении нейробластомы, где 3 из 11 пациентов достигли полной ремиссии и лечения саркомы, где у 4 из 17 больных достигнута стабилизация [6]. В зависимости от введения клеточного препарата, результаты терапии отличаются. Например, исследования показали хорошие результаты при введении клеток локально – в опухоль или область, из которой опухоль была удалена хирургически [7].

### Побочные эффекты CAR-T терапии

Несмотря на эффективность Car-t терапии, имеется ряд побочных эффектов, в виде цитокинового шторма, развития рецидивов после инфузии, непродолжительной пролиферации и персистенции в организме, высокая стоимость производства T- и так далее. Тем не менее, исследования продолжаются. На сегодняшний день существует 3 основных побочных эффекта при адоптивной иммунотерапии CAR-T лимфоцитами. Самым тяжелым и частым из них является синдром цитокинового шторма, который является серьезной угрозой жизни х пациентов и требует введения моноклональных антител и T-клеток, экспрессирующих CAR-T. В основе синдрома цитокинового шторма лежит гиперпродукция провоспалительных цитокинов, источником которых являются сами CAR-T лимфоциты, это ведет к системной воспалительной реакции, что является причиной полиорганной недостаточности и в последующем летального исхода. Клиническими симптомами СЦШ являются: лихорадка, тахикардия, гипотензия, отёки, нарушение сознания, диффузная лимфаденопатия, гепатоспленомегалия, кожные реакции. Вторым побочным эффектом является нейротоксичность, которая проявляется афазией, нарушением сознания, миоклонусом, судорогами, галлюцинациями. Третьим и очень частым осложнением является В-лимфопения, что обусловлена закономерной деплецией пула нормальных В-лимфоцитов. Это состояние сопровождается гипогаммаглобулинемией, что требует внутривенного введения

иммуноглобулинов. Помимо незначительного терапевтического эффекта, неизбежны и ряд побочных эффектов терапии солидных опухолей: car-t атакуют здоровые ткани сердца, мозга, печени, легких. [8]

Производство CAR-T включает в себя несколько этапов.

Первым этапом является анаферез лейкоцитов периферической крови пациента. Необходимо собрать не менее  $100 \times 10^6$  клеток, причем забор крови необходимо делать до химиотерапии. Выделяют отдельные популяции лимфоцитов путем иммуномагнитной селекции и / или депеции моноцитов путем адгезии или элютриации.

Далее происходит активация Т-лимфоцитов для последующей экспансии клеток и эффективной трансдукции ретро- и лентивирусными векторами. Чаще всего используется активация с использованием специального реагента – анти-CD3/CD28-антител, иммобилизированных на магнитном носителе разного размера в присутствии интерлейкина 2 или других цитокинов. В 2004 году в своем исследовании Дж. Ким и соавторы предложили активацию CAR-T антиген-презентирующими клетками пациента, а К. Башур и Р. Ларсон рассказывали о растворимом реагенте стимуляции ExparameterTM, после стимуляции которым, Т-клетки легко трансдуцировались специфичной для CD19 конструкцией CAR.

Следующий этап– это генетическая модификация. Сегодня широко применяются гамма-ретровирусные и лентивирусные клетки. В своем исследовании в 2012 году Д.Д Суэрт, А.Шамбах и К.Баум доказали безопасность использования этих вирусов путем наблюдения за пациентами, получавшим терапию модифицированными гамма-ретровирусными Т-лимфоцитами. Лентивирусные векторы теоретически более безопасны, с точки зрения инсерционного мутагенеза и злокачественной трансформации, однако к минусам этого способа относят отсутствие стабильных линий и высокую стоимость. Оба метода дают высокую эффективность и постоянную экспрессию химерного антигена. В январе 2014 года Х.Сингх из университета Техаса предложил новый подход к генетической модификации CAR-T с помощью усовершенствованных

ДНК-векторов, полученных из системы транспозон-транспоза. После электропорации этой модели автор отмечал повышение эффективности интеграции плазмид, используемых для экспрессии CAR-T. Кроме того, что в отличие от вирусных векторов, по-новому модифицированные клетки обладали большей безопасностью, в исследовании подчеркивался гибкий и экономичный подход к разработке модифицированных Т-клеток, однако клинических испытаний с этими модификациями пока недостаточно. В одном исследовании при создании CAR-Tклеток авторы применили модификацию в виде внедрения гепариназы, которая даёт – лучшую инфильтрацию внутрь опухоли, расщепляет гепариносουλфат, являющийся частью межклеточного матрикса, образующего опухолевую строму. Кроме улучшенной инфильтрации, была замечена более высокая противоопухолевая активность CAR-T [9].

Следующим этапом производства является экспансия модифицированных Т-клеток с помощью искусственных антиген-презентирующих клеток K-562, или же с помощью биореакторов, с использованием цитокинов, поддерживающих пролиферацию Т-лимфоцитов – ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15. Экспансия в этих случаях поддерживают состав самой среды, температуру и необходимый уровень газов. В 2015 году П. Кумаресан предложил использовать биореактор, который позволяет выполнять правильную последовательность производства: селекция отдельных популяций, трансдукция и экспансия Т-лимфоцитов.

Последним этапом производства является контроль - тестирования на безопасность и эффективность, после чего клеточный препарат может вводиться пациенту или быть подвергнут криоконсервации [9].

Известно, что терапия CAR-T может быть токсичной для здоровых клеток. Снижение этого эффекта достигается применением «суицидных систем». Они основаны на введении в геном CAR-T дополнительного модуля с «геномом смерти», продукт которого в присутствии определенных соединений избирательно уничтожает модифицированные лимфоциты, что сводит к минимуму токсичность терапии. Первая система – метаболическая, на основе тимидинкиназы вируса простого герпеса человека и ганцикловира. Вторая –

индоцированная, каспаза iCasp9 плюс инертные, индуцирующие димеризацию соединения, например AP1903. Третья – поверхностные эпитопы, против которых уже есть доказанные клинически антитела – tEGFR и цетуксимаб, CD20 и ритуксимаб [9].

К сожалению, подавляющее количество подходов, обеспечивающих безопасность CAR-T продуктов, приведенных выше, работают тогда, когда организму уже нанесен ущерб и необходимо быстро остановить развитие процесса. Необходимы дальнейшее исследование и внедрение их в практику, чтобы предотвратить развитие побочных эффектов.

### Список литературы:

1. Маус М.В., Хаас А.Р., Битти Г.Л. и др. Т-клетки, экспрессирующие химерные антигенные рецепторы, могут вызывать анафилаксию у людей // Рак Иммунол. Рез. 2013. № 1. С. 26–31.

2. Гилл С., Маус М.В., Портер Д.Л. Т-клеточная терапия химерными антигенными рецепторами: 25 лет разработки // Обзоры крови. 2016. № 30(3). С. 157-167.

3. Адусумилли П.С., Черкасский Л., Виллена-Варгас Дж. и др. Регионарная доставка мезотелин-таргетной терапии CAR Т-клетками создает мощный и продолжительный CD4-зависимый опухолевый иммунитет. 2014.

4. Каруана И., Савольдо Б., Хойос В. и др. Гепараназа способствует инфильтрации опухоли и противоопухолевой активности CAR-перенаправленных Т-лимфоцитов. Нац. Мед. 2015.

5. Браун С.Э., Ализаде Д., Старр Р. и др. Регрессия глиобластомы после Т-клеточной терапии химерными антигенными рецепторами. Н. англ. // Дж. Мед. 2016. № 375 (26). С. 2561–259.

6. Павлова А.А. Масчан Адоптивная иммунотерапия генетически модифицированными Т-лимфоцитами, экспрессирующими химерные антигенные рецепторы // ОГ. 2017. №1.



7. Слейни С.Ю., Кершоу М.Х., Дарси П.К. Транспортировка Т-клеток в опухоли // Рак Рез. 2014. № 74. С. 7168–7174.

8. Калос М., Левин Б.Л., Портер Д.Л. и соавт. Т-клетки с химерными антигенными рецепторами обладают мощным противоопухолевым действием и могут устанавливать память у пациентов с прогрессирующим лейкозом. 2011. № 3

9. Адусумилли П.С., Черкасский Л., Виллена-Варгас Дж. и др. Регионарная доставка мезотелин-таргетной терапии CAR Т-клетками создает мощный и продолжительный CD4-зависимый опухолевый иммунитет. 2014. № 6.