

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-79-86



Исследование подавления роста опухоли, экспрессирующей раково-эмбриональный антиген, новым высокотехнологичным препаратом карплазмин (CAR-T-терапия) у мышей линии Balb/c nude

В.К. Боженко¹, А.М. Шишкин¹, А.Н. Шкопоров², Я.Ю. Киселева¹, Т.М. Кулинич¹, О.Б. Большакова¹, Е.А. Кудинова¹, В.А. Солодкий¹

¹ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Профсоюзная, 86;

²APC Microbiome Ireland, School of Microbiology & Department of Medicine, University College; College Road, T12 K8AF Cork, Ireland

Контакты: Яна Юрьевна Киселева yukiseleva@rncrr.ru

Введение. Адоптивная иммунотерапия на основе химерных антигенных рецепторов (CAR) рассматривается как перспективное направление в лечении солидных злокачественных опухолей. Для получения генетически модифицированных Т-лимфоцитов человека в настоящее время чаще всего используется ленти-/ретровирусная трансдукция. Однако проблемы безопасности, связанные с продукцией вирусного вектора и возможной нежелательной модификацией генома, ограничивают клиническую применимость CAR-T-клеток. Поэтому невирусные методы трансфекции, в частности электропорация с использованием ДНК- или РНК-векторов, активно исследуются как подход для получения CAR-T-лимфоцитов.

Цель исследования – оценка противоопухолевой активности *in vivo* нового высокотехнологичного лекарственного средства карплазмин, предназначенного для CAR-T-терапии опухолей, экспрессирующих раково-эмбриональный антиген (РЭА).

Материалы и методы. Карплазмин получен методом электропорации активированных лимфоцитов человека плазмидной ДНК, несущей ген CAR 3-го поколения, специфичный к РЭА. Исследование выполнено на модели ксено-трансплантата колоректального рака человека, полученной при интраперитонеальном введении РЭА-положительных клеток линии НСТ116 бестимусным мышам линии Balb/c nude. Введение карплазмина проводили 1 раз в неделю, начиная с 3-го дня после прививания клеток НСТ116. Мышам 2 контрольных групп вводили либо лимфоциты, подвергнутые электропорации без внесения плазмиды (пульс-лимфоциты), либо культуральную среду RPMI-1640 (группа без лечения).

Результаты. *In vivo* карплазмин демонстрировал выраженное противоопухолевое действие. Семь еженедельных введений препарата привитым мышам привели к выраженному эффекту противоопухолевой терапии: 80 % животных в экспериментальной группе выжили (при этом у 40 % мышей наблюдалась полная ремиссия без признаков определяемой опухоли), тогда как в контрольной (без лечения) группе 100 % животных погибли.

Заключение. Результаты доклинических исследований эффективности демонстрируют, что карплазмин является перспективным препаратом для терапии РЭА-позитивных интраперитонеальных опухолей.

Ключевые слова: адоптивная иммунотерапия, химерный антигенный рецептор, CAR-T-терапия, электропорация, раково-эмбриональный антиген

Для цитирования: Боженко В.К., Шишкин А.М., Шкопоров А.Н. и др. Исследование подавления роста опухоли, экспрессирующей раково-эмбриональный антиген, новым высокотехнологичным препаратом карплазмин (CAR-T-терапия) у мышей линии Balb/c nude. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(1):79–86. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-79-86

Study of the suppression of a tumor growth expressing a carcinoembryonic antigen with a new high-tech drug carplazmin (CAR-T therapy) in Balb/c nude mice

V.K. Bozhenko¹, A.M. Shishkin¹, A.N. Shkoporov², Y. Yu. Kiseleva¹, T.M. Kulnich¹, O.B. Bolshakova¹, E.A. Kudinova¹, V.A. Solodkiy¹

¹Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Ministry of Health of Russia; 86 Profsoyuznaya St., Moscow 117997, Russia;

²APC Microbiome Ireland, School of Microbiology & Department of Medicine, University College; College Road, T12 K8AF Cork, Ireland

Contacts: Yana Yurevna Kiseleva yykiseleva@ncrr.ru

Introduction. Adoptive immunotherapy based on chimeric antigen receptors (CAR) is considered as a promising direction in the treatment of solid malignant tumors. To produce genetically modified human T-lymphocytes, lenti/retroviral transduction is currently most often used. However, safety concerns associated with the viral vector production and possible unwanted genome modification limit the clinical utility of CAR-T cells. Therefore, non-viral transfection methods, in particular electroporation, using of DNA or RNA vectors, are being actively studied as a method for producing CAR-T lymphocytes.

Aim. To evaluate *in vivo* antitumor activity of the new high-tech drug carplasma, intended for CAR-T therapy of tumors expressing carcinoembryonic antigen (CEA).

Materials and methods. Carplasma was obtained by electroporation of activated human lymphocytes with plasmid DNA carrying the third generation CAR gene specific to CEA. The study was performed on a human colorectal cancer xenograft model obtained by intraperitoneal injection of CEA-positive HCT116 cell line to athymic Balb/c nude mice. Carplasma treatment was carried out once a week, starting from the third day after HCT116 cell inoculation. Mice in the two control groups were treated with either electroporated lymphocytes without plasmid addition (pulse-lymphocytes) or RPMI-1640 culture medium (group without treatment).

Results. *In vivo*, carplasma demonstrated a pronounced antitumor effect. Seven weekly injections of the drug to inoculated mice led to a prominent effect of antitumor therapy: 80 % of the animals in the experimental group survived (with 40 % of the mice had a complete remission without signs of a detectable tumor), compared to 100 % death in the control group (without treatment).

Conclusion. The results of preclinical efficacy studies demonstrate that carplasma is a promising drug for the treatment of CEA-positive intraperitoneal tumors.

Keywords: adoptive immunotherapy, chimeric antigen receptors, CAR-T therapy, electroporation, carcinoembryonic antigen

For citation: Bozhenko V.K., Shishkin A.M., Shkoporov A.N. et al. Study of the suppression of a tumor growth expressing a carcinoembryonic antigen with a new high-tech drug carplasma (CAR-T therapy) in Balb/c nude mice. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(1):79–86. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-79-86

ВВЕДЕНИЕ

Лечение злокачественных новообразований на поздних стадиях развития и рецидивирующих опухолей с использованием традиционных методов, таких как хирургия, радио- и химиотерапия, как правило, неэффективно. Это стимулировало появление новых подходов к терапии злокачественных новообразований, одним из которых является адоптивная иммунотерапия на основе Т-клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы (chimeric antigen receptor, CAR) заданной специфичности. Успешное применение CAR-T-терапии с продолжительным периодом полной ремиссии показано для пациентов с гемобластомами при переносе CAR-T-лимфоцитов, направленных против CD19, CD20, иммуноглобулина каппа (Ig-каппа) и BCMA [1–3]. Адаптация CAR-T-терапии для лечения солидных опухолей в настоящее время рассматривается как перспективное направление в лечении злокачественных заболеваний [1]. Для доставки CAR в первичные Т-клетки человека широко используется высокоэффективная ленти-/ретровирусная трансдукция, при которой, однако, из-за интеграции нового генетического материала в геном клетки существует риск потенциальной аутоагрессии или злокачественной трансформации.

В настоящее время нами разрабатывается высокотехнологичный лекарственный препарат с рабочим названием карплазмин, предназначенный для лечения РЭА-положительных опухолей человека (РЭА – раково-эмбриональный антиген). Он представляет собой

лимфоциты, генетически модифицированные *ex vivo* ДНК-плазмидой, доставленной в клетку с помощью электропорации. Данная плазида обеспечивает экспрессию на поверхности клеток CAR с высокой аффинностью к опухолевому варианту РЭА. Распознающая часть CAR является фрагментом варибельного участка моноклонального антитела 3С1, специфичного к эпитопу 4 (по классификации GOLD [4]) домена А1В1 молекулы РЭА [4, 5]. 3С1 было выбрано из панели антител, специфичных к различным эпитопам РЭА, при анализе их связывания с поверхностью РЭА-положительных культур клеток HT29, HCT116 и A549 [5, 6].

Ранее нами было показано, что карплазмин обладает способностью поражать линии опухолевых клеток человека HT29 (колоректальная аденокарцинома), HCT116 (колоректальная карцинома) и A549 (карцинома легкого), экспрессирующих РЭА, и имеет минимальную цитотоксичность по отношению к РЭА-отрицательным клеткам [5–7].

В настоящей работе в рамках доклинических исследований препарата карплазмин были изучены его противоопухолевые свойства на модели гетеротопического ксенографта колоректального рака человека на мышах линии Balb/c nude.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тестируемый препарат. Карплазмин – лимфоциты, генетически модифицированные ДНК-плазмидой 3С1-3g («Медгамал», Россия). Эта плазида имеет молекулярную массу 3458 кДа и кодирует CAR 3-го поколения [8],

состоящий из антиген-распознающего домена scFv (клон мышинового антитела 3C1, специфичного к РЭА), шарнирного участка CD8, трансмембранного домена CD28 и активационных доменов CD28, CD137 (4-1BB), CD247 (ζ -цепь).

Клеточная линия. Клетки перевиваемой культуры колоректального рака человека HCT116 культивировали в питательной среде DMEM (содержание глюкозы 4,5 г/л; ООО «ПанЭко», Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, Gibco, Paisley, Великобритания) и 10 мкг/мл гентамицина (ООО «ПанЭко», Россия).

Введение опухолевых клеток HCT116 бестимусным мышам. Эксперименты на животных были проведены на базе филиала Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (Пушино, Россия). В эксперимент были включены 40 семинедельных самцов мышей линии Balb/c nude, приобретенных в питомнике лабораторных животных «Пушино» – филиале Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. Для прививания опухоли готовили суспензию клеток культуры HCT116 по стандартной методике, используя 0,25 % раствор трипсин-этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (ООО «ПанЭко», Россия). Полученную суспензию отмывали бессывороточной средой DMEM при 300 г в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в этой же среде, количество клеток в суспензии определяли на гематологическом анализаторе Адвия-60 (Bayer HealthCare LLC, США). Суспензию клеток линии HCT116 вводили внутривентриально в количестве $1,9 \times 10^6$ клеток/мышь (объем суспензии составлял 0,375 мл) 30 мышам экспериментальной группы. Еще 10 мышей, которым опухолевые клетки не вводили, составили группу интактных мышей, необходимую для контроля качества содержания и исключения возможной смертности в связи с иммунной недостаточностью и присоединения инфекций.

Получение первичной культуры лимфоцитов человека и их активация. Мононуклеары периферической крови выделяли из гепаринизированной периферической крови центрифугированием в градиенте плотности фиколла (1,077 г/мл; ООО «ПанЭко», Россия) при 400 г в течение 25 мин. Мононуклеары периферической крови отмывали фосфатно-солевым буфером, pH 7,4 (ООО «ПанЭко», Россия) и культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), L-глутамин и 10 мкг/мл гентамицина, при 37 °C и 5 % CO₂. Количество и состав выделенных мононуклеаров периферической крови контролировали на гематологическом анализаторе Адвия-60. Лимфоциты стимулировали к пролиферации добавлением 50 Ед/мл интерлейкина-2 (НПК «Биотех», Россия) и 2 мкг/мл фитогемагглютина (ООО «ПанЭко», Россия). Клетки культивировали в чашках Петри с адгезивным покрытием в сте-

рильных условиях при температуре 37 °C во влажной атмосфере с 5 % CO₂ в течение 24 ч. За это время происходила адгезия содержащихся в мононуклеарной фракции крови моноцитов к дну чашек Петри. Неприкрепившиеся клетки, представляющие собой в основном активированные лимфоциты, смывали пипетированием и использовали для электропорации.

Приготовление препарата карплазмин и его введение мышам. Электропорацию активированных лимфоцитов проводили на приборе Neon (Invitrogen, США) с использованием набора Neon™ Transfection System 100 μ L Kit согласно рекомендациям производителя. Суспензию активированных лимфоцитов делили пополам. Одну часть трансфецировали плазмидой 3C1-3 g, другую подвергали электропорации в том же режиме без внесения плазмиды (пульс-лимфоциты). Для трансфекции 1 образца объемом 100 мкл использовали 1,5–2 млн клеток, 7 мкг плазмиды 3C1-3 g (стерильный раствор с концентрацией 1 мг/мл) и следующий режим: напряжение пульса 2200 В, продолжительность пульса 20 мс, количество пульсов – 1. Клетки после каждой трансфекции переносили в чашки Петри и культивировали в 5 мл среды RPMI-1640 с 10 % ЭТС без антибиотика в стерильных условиях при температуре 37 °C, 5 % CO₂ и относительной влажности 95 % в течение 24 ч. Через 1 сут лимфоциты дважды отмывали в 10 мл среды RPMI-1640 при 300 г в течение 5 мин. Карплазмин и пульс-лимфоциты разводили средой RPMI-1640 до одинаковой концентрации клеток. Полученные суспензии клеток вводили интраперитонеально бестимусным мышам в объеме 0,2 мл в разные сроки после прививания опухоли. Мыши с привитой опухолью были разделены на 3 группы: 10 мышей в каждой. Животным одной группы вводили карплазмин, другой – пульс-лимфоциты, третьей – тот же объем среды RPMI-1640.

Оценка содержания CD3-лимфоцитов человека в смывах брюшной полости мышей, получавших лечение. Смывы получали из брюшной полости животных в конце эксперимента (на 68-й день). Смывы фильтровали с помощью сита с диаметром пор 40 мкм, центрифугировали при 250 г 5 мин, надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере с добавлением 2 % ЭТС и 2 мМ ЭДТА. Полученную суспензию клеток окрашивали моноклональными мышинными антителами, меченными FITC, специфичными к рецептору CD3 человека, и изотипическими антителами IgG1, меченными FITC (Becton Coulter, США), согласно рекомендациям производителя. Клетки анализировали в течение 2 ч после окраски на проточном цитофлуориметре FC500 (Becton Coulter Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование противоопухолевой активности карплазмина проводилось на модели ксенографта колоректального рака человека (клеточная линия

НСТ116) у бестимусных мышей линии Balb/c nude. Суспензию клеток линии НСТ116 вводили однократно внутрибрюшинно 30 бестимусным мышам. Животные были разделены на 3 равные группы. Для удобства группы обозначены следующим образом: 1-я – мыши, которым внутрибрюшинно вводили карплазмин; 2-я – группа сравнения, в которой мышам внутрибрюшинно вводили лимфоциты, подвергнутые электропорации без добавления ДНК-плазмиды (пульс-лимфоциты); 3-я – контрольная (мыши не получали лечения, внутрибрюшинно им вводили среду RPMI-1640). Внутрибрюшинные инъекции животным начали делать на 3-й день после прививания опухоли и далее, начиная с 14-го дня, вводили с интервалом 1 раз в неделю в течение 6 нед. Количество вводимых лимфоцитов составляло 1–1,5 млн на инъекцию.

Рост привитой культуры происходил в основном в виде солидных опухолей, спаянных с париетальной брюшиной и прорастающих ее. Асцит наблюдался в терминальной стадии развития опухоли и быстро приводил к гибели экспериментальных животных. Внутрибрюшинный характер роста опухоли после прививания делал невозможным контроль ее размеров. Для мониторинга состояния животных проводили их еженедельное взвешивание и визуальное наблюдение за опухолевыми узлами, появляющимися после прорастания опухолью брюшины. Во всех группах до 28-го дня после прививания опухоли наблюдалось постепенное увеличение массы тела мышей. Далее в группах с привитой опухолью отмечалась стабилизация показателей массы тела, а в группе интактных

мышей продолжалось ее линейное возрастание еще в течение 2 нед.

Динамика появления опухолевых узлов у мышей представлена в таблице. Первые видимые опухолевые узлы появились у 2 мышей 3-й группы на 14-й день после прививания. При этом их возникновение у животных 1-й и 2-й групп было отсрочено на неделю; опухолевые узлы появились на 21-е сутки у 4 мышей в каждой группе.

Кривые выживаемости мышей представлены на рис. 1. К 8-й неделе наблюдения (день 56) все животные в 3-й группе погибли. На этот момент в экспериментальных 1-й и 2-й группах оставались живыми 80 и 60 % мышей соответственно. Внешний вид бестимусных животных в 1-й и 3-й группах представлен на рис. 2.

Эксперимент был продолжен до 68-го дня после прививания с целью установления динамики гибели мышей в 1-й и 2-й группах. На момент окончания эксперимента в 1-й группе оставалось 6 мышей (2 – с признаками опухоли и 4 – без них), в то время как в группе 2 – только 3 мыши, причем у 2 из них наблюдались признаки опухоли и только у 1 их не было (см. таблицу). У мышей 1-й и 2-й групп были исследованы опухоли и внутренние органы, а также проведены смывы с брюшной полости для получения лимфоцитов с целью их цитофлуориметрического анализа. Следует отметить, что у 2 мышей с опухолью из 2-й группы отмечались признаки начинающегося асцита. У животных с опухолью из 1-й группы, получавших карплазмин, признаков асцита не было. Оставшиеся мыши

Число живых мышей с видимыми опухолевыми узлами и без узлов в разных группах по дням после прививания клеток НСТ116

Number of alive mice with visible tumor nodes and number of mice without nodes in groups by days after HCT116 cell inoculation

Группа Group	Число мышей, n Number of mice, n								
	7-й день 7 th day	14-й день 14 th day	21-й день 21 th day	28-й день 28 th day	35-й день 35 th day	42-й день 42 th day	49-й день 49 th day	56-й день 56 th day	68-й день 68 th day
1-я (карплазмин): Group 1 (carplasmin):									
число мышей с опухолевыми узлами, n number of mice with visible tumor nodes, n	0	0	4	5	5	5	5	4	2
число мышей без узлов, n number of mice without visible tumor nodes, n	10	10	6	5	5	5	4	4	4
2-я (пульс-лимфоциты): Group 2 (pulse-lymphocytes):									
число мышей с опухолевыми узлами, n number of mice with visible tumor nodes, n	0	0	4	7	7	6	5	5	2
число мышей без узлов, n number of mice without visible tumor nodes, n	10	10	6	3	3	1	1	1	1
3-я (без лечения, среда RPMI-1640): Group 3 (no treatment, RPMI-1640 medium):									
число мышей с опухолевыми узлами, n number of mice with visible tumor nodes, n	0	2	5	6	6	4	2	0	0
число мышей без узлов, n number of mice without visible tumor nodes, n	10	8	5	4	2	2	1	0	0

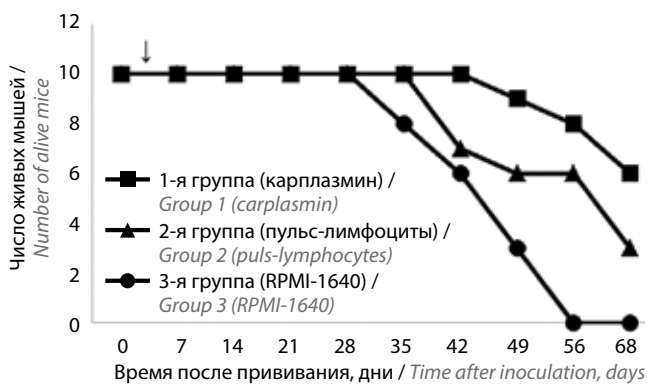


Рис. 1. Кривые выживаемости бестимусных мышей с привитыми опухолевыми клетками HCT116 в группах, получавших лечение карплазмином, пульс-лимфоцитами и не получавших лечения. Стрелка указывает время начала терапии

Fig. 1. Survival curves of athymic mice with transplanted HCT116 tumor cells in groups treated with carplazmin, pulse-lymphocytes and not treated. The arrow indicates the start time of treatment



Рис. 2. Внешний вид бестимусных мышей с привитой опухолью HCT116 на конец наблюдения: а – группы карплазмина; б – группы без лечения (в терминальной стадии развития опухоли)

Fig. 2. Appearance of athymic mice with transplanted HCT116 tumor at the end of the observation: а – in a group treated with carplazmin; б – in a group without treatment (in the terminal stage of tumor development)

(1 мышь 2-й группы и 4 мыши 1-й группы) наблюдались в течение 3 мес без признаков опухолевого роста.

Таким образом, можно заключить, что у этих животных произошло полное излечение.

Следует отметить, что опухоли, развившиеся у мышей, имели плохое кровоснабжение и уже при размере около $0,5 \times 0,5$ см содержали некротизированные участки. Узловой рост значительной части опухоли затруднял цитотоксическое воздействие со стороны вводимых интраперитонеально лимфоцитов. В то же время можно предположить, что ранние сроки начала противоопухолевой терапии – на 3-й день после прививания опухоли – обеспечивали цитотоксическое воздействие на опухоль незначительных размеров, что снижало темпы развития новообразования или вело к его лизису до достижения макроскопических размеров в 1-й и 2-й группах. Следует также учитывать, что основной причиной гибели экспериментальных животных было развитие опухолевого асцита. Как правило, не наблюдалось прорастания опухоли в жизненно важные органы и не было обнаружено отдаленных метастазов. По-видимому, в таких условиях интраперитонеальные инъекции цитотоксических лимфоцитов могли сдерживать развитие асцита и удлинять продолжительность жизни мышей.

Цитофлуориметрический анализ смывов с брюшной полости мышей, проведенный спустя 13 дней после окончания введения лимфоцитов человека, показал наличие у мышей 1-й группы большого количества CD3-лимфоцитов человека, составлявших основную часть клеточной массы смыва. В то же время в смывах мышей 2-й группы CD3-лимфоцитов практически не содержалось. Результаты проточной цитометрии представлены на рис. 3. Полученные данные могут говорить об избирательном накоплении карплазмина в областях, прилегающих к опухоли, и о продолжительности оказываемого ими цитотоксического эффекта. Можно предположить, что это связано с повышением выживаемости и/или пролиферации активированных антигеном лимфоцитов.

Таким образом, лимфоциты, трансфицированные плазмидой, кодирующей РЭА-специфичный химерный антигенный рецептор, оказывают выраженное противоопухолевое воздействие *in vivo* и сохраняются в брюшной полости в течение периода времени, достаточного для противодействия развитию РЭА-положительной опухоли при условии повторных еженедельных инъекций. Важным является тот факт, что на момент гибели 100 % мышей в контрольной группе, в группе мышей, получавших карплазмин, 80 % животных оставалось живыми. Также принципиально важно, что 40 % мышей в этой группе были излечены полностью.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мишенью карплазмина является РЭА – антиген, высокоэкспрессированный на поверхности опухолевых клеток аденокарцином желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы, немелкоклеточного

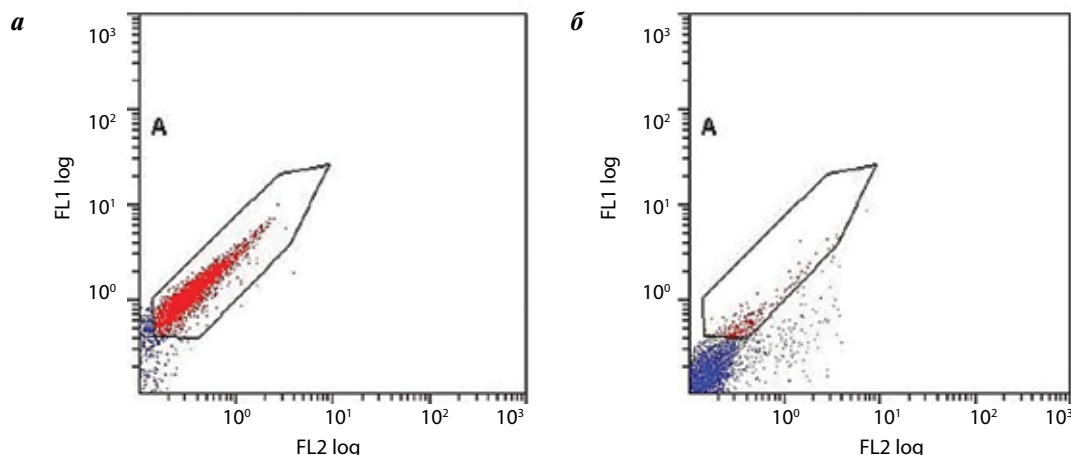


Рис. 3. Результаты цитофлуориметрического анализа лимфоцитов, содержащихся в смыве с брюшной полости мышей, получавших карплазмин (а) и пульс-лимфоциты (б). Красным цветом показаны лимфоциты, несущие на поверхности рецептор CD3, синим — лимфоциты, у которых рецептор CD3 отсутствует

Fig. 3. Results of flow cytometric analysis of human lymphocytes contained in peritoneal lavage of mice treated with carplazmin (a) and pulse-lymphocytes (б). Lymphocytes bearing the CD3 receptor on the surface are shown in red, lymphocytes in which the CD3 receptor is absent, in blue

рака легких, рака молочной железы и при ряде других опухолей различной локализации [9]. В то же время в норме он экспрессирован на столбчатых эпителиальных и бокаловидных клетках толстой кишки, шеечных клетках выводных протоков фундальных желез и клетках пилорических желез желудка, клетках плоского эпителия языка, пищевода и шейки матки, протоков потовых желез и эпителиальных клетках простаты. Однако локализация РЭА на нормальных клетках ограничена апикальной поверхностью мембран и, таким образом, топологически отделена от воздействия иммунных клеток [9, 10]. При этом экспрессия РЭА на клетках аденокарциномы толстой кишки теряет свою полярность, а уровень ее значительно возрастает (до 35 раз), что усиливает различия между нормальной и опухолевой тканью [11]. Клинические испытания РЭА-специфических CAR-T-лимфоцитов в группе пациентов с метастатическим колоректальным раком показали минимальное проявление цитокинового шторма и стабилизацию заболевания в течение 34 нед у 7 пациентов против прогрессирования у 3 пациентов [12]. Эти данные, с одной стороны, указывают на минимальные побочные эффекты РЭА-специфичной CAR-T-терапии, а с другой — на необходимость создания и тестирования новых конструкций химерных рецепторов к другим эпитопам РЭА для повышения эффективности этой терапии.

По данным литературы, наряду с лентивирусными конструкциями, ДНК-плазмидами для создания CAR-T-клеток может использоваться матричная РНК (мРНК). Введение в клетку мРНК отличают быстрая и эффективная экспрессия CAR и высокая жизнеспособность клеток [13, 14]. Тем не менее ДНК является более стабильным генетическим материалом и может сохраняться в клетках длительное время [15], приводя к пролонгированной экспрессии CAR. Еще одним

недостатком мРНК является ее меньшая стабильность по сравнению с ДНК. Для получения, хранения и использования мРНК в качестве лечебного препарата необходимо создать специальные условия, включающие рабочее пространство, свободное от РНКаз. Использование ДНК не требует таких условий.

Для получения карплазмиды, а именно для введения в лимфоциты ДНК-плазмиды, использовался метод электропорации. Такой подход позволил получить модифицированные клетки, обладающие выраженной цитотоксической активностью в отношении РЭА-положительных клеточных культур НСТ116, НТ29 и умеренной — в отношении клеточной культуры А549. Цитотоксический эффект определялся с помощью МТТ-теста и измерения активности лактатдегидрогеназы после 24-часовой инкубации трансфицированных лимфоцитов с клетками-мишенями [5]. Кроме того, с помощью метода проточной цитофлуориметрии выявлен более чем 50 % цитотоксический эффект после 5-часовой инкубации клеток линии НСТ116, предварительно окрашенных CFDA-SE, с лимфоцитами, экспрессирующими CAR, в соотношении 1 : 10 [5, 7]. Как альтернатива данному подходу, CAR-лимфоциты могут быть получены с помощью трансдукции с использованием ретровирусных и лентивирусных векторов [16, 17]. Так, применив для трансдукции ретровирусный вектор MFG, D.M. Vargrett и соавт. [14] получали лимфоциты человека со 2-м поколением CAR, которые затем тестировали на модели мышей с привитой опухолью (генно-инженерная культура клеток MIPCEA с искусственно полученной экспрессией РЭА). Лечение РЭА-специфичными лимфоцитами проводилось в 2 вариантах: начиная с 1-го и 6-го дня после прививания РЭА-экспрессирующих клеток. При 1-м варианте терапии все мыши выжили, а при 2-м выжила только 1 из 4 особей

[16]. Таким образом, независимо от метода доставки ДНК (трансфекция методом электропорации или трансдукция) CAR-лимфоциты способны эффективно подавлять РЭА-положительную опухоль на мышинной модели. Однако, по нашему мнению, получение CAR-лимфоцитов с помощью доставки ДНК-плазмиды в клетку методом электропорации является более предпочтительным. Во-первых, это наиболее быстрый и дешевый способ получения CAR-лимфоцитов. Во-вторых, при таком подходе отсутствует риск инсерционного мутагенеза и активации онкогенов. В-третьих, постоянная антигенная стимуляция CAR-лимфоцитов клетками опухоли в организме реципиента приводит к неконтролируемому выбросу лимфокинов (так называемый цитокиновый шторм), который трудно купировать. В этом случае относительная кратковременность жизни CAR-лимфоцитов, полученных методом трансфекции, в сочетании с возможностью их дозирования и дробного введения позволяет скорректировать лечение и смягчить побочные эффекты терапии. Напротив, при трансдукции формируется лимфоцитарная популяция, в которой трансгены стабильно и произвольно интегрированы в хромосомы, что создает в том числе риск некон-

тролируемой пролиферации и длительной экспрессии конструкции CAR.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании был достигнут выраженный противоопухолевый эффект после применения карплазмина (РЭА-CAR-T) (в экспериментальной группе 80 % мышей выжили, тогда как в контрольной группе 100 % мышей погибли), зафиксирована большая продолжительность жизни в экспериментальных группах по сравнению с контрольной. В группе, получавшей терапию карплазмином, выживаемость на момент гибели всех мышей в контрольной группе составила 80 %, у 40 % мышей наблюдалась полная ремиссия без признаков определяемой опухоли в сроки наблюдения более 3 мес. Показано, что CAR-лимфоциты длительно сохраняются в брюшной полости. Использование электропорации при получении карплазмина создает возможность оптимизации вводимой дозы препарата в повторных инъекциях с учетом ответа реципиента, что позволяет снизить вероятность такого осложнения, как цитокиновый шторм, которое часто наблюдается при введении долгоживущих лимфоцитов, трансдуцированных лентивирусами.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Arabi F., Torabi-Rahvar M., Shariati A. et al. Antigenic targets of CAR T cell therapy. A retrospective view on clinical trials. *Exp Cell Res* 2018;369(1):1–10. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.05.009
2. Brentjens R.J., Davila M.L., Riviere I. et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 2013;5(177):177ra38. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005930
3. Kuehn B.M. The promise and challenges of CAR-T gene therapy. *JAMA*. 2017;318(22):2167–9. DOI: 10.1001/jama.2017.15605
4. Bjerner J., Lebedin Y., Bellanger L. et al. Protein epitopes in carcinoembryonic antigen. Report of the ISOBM TD8 workshop. *Tumour Biol* 2002;23(4):249–62. DOI: 10.1159/000067255
5. Шишкин А.М. Разработка метода адоптивной иммунотерапии раково-эмбриональный антиген позитивных опухолей человека: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2015. 22 с. Shishkin A.M. Development of the method of adaptive immunotherapy cancer-embryonic antigen of positive human tumors: abstract of the dissertation of the Candidate of Medical Sciences. Moscow, 2015. 22 p. (In Russ.).
6. Bojenko V.K., Shramova E.I., Shkoporov A.N. et al. Monomolecular chimeric T-cell receptor to a carcinoembryonic antigen. WO2013154458A2, 2013.
7. Bozhenko V.K., Shramova E.I., Shishkin A.M. et al. Characteristics of new monomolecular chimeric T-cell receptors to carcinoembryonic antigen. *Bull Exp Biol Med* 2013;156(1):165–71. DOI: 10.1007/s10517-013-2302-2
8. Skorka K., Ostapinska K., Malesa A. et al. The application of CAR-T cells in haematological malignancies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2020;68(6):34. DOI: 10.1007/s00005-020-00599-x
9. Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol* 1999;9(2):67–81. DOI: 10.1006/scbi.1998.0119
10. Nap M., Mollgard K., Burtin P. et al. Immunohistochemistry of carcino-embryonic antigen in the embryo, fetus and adult. *Tumour Biol* 1988;9(2–3):145–53. DOI: 10.1159/000217555
11. Boucher D., Courmoyer D., Stanners C.P. et al. Studies on the control of gene expression of the carcinoembryonic antigen family in human tissue. *Cancer Res* 1989;49(4):847–52.
12. Zhang C., Wang Z., Yang Z. et al. Phase I escalating-dose trial of CAR-T therapy targeting CEA(+) metastatic colorectal cancers. *Mol Ther* 2017;25(5):1248–58. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.03.010
13. Yoon S.H., Lee J.M., Cho H.I. et al. Adoptive immunotherapy using human peripheral blood lymphocytes transferred with RNA encoding Her-2/neu-specific chimeric immune receptor in ovarian cancer xenograft model. *Cancer Gene Ther* 2009;16(6):489–97. DOI: 10.1038/cgt.2008.98
14. Barrett D.M., Zhao Y., Liu X. et al. Treatment of advanced leukemia in mice with mRNA engineered T cells. *Hum Gene Ther* 2011;22(12):1575–86. DOI: 10.1089/hum.2011.070
15. Mitchell D.A., Nair S.K. RNA-transfected dendritic cells in cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 2000;106(9):1065–9. DOI: 10.1172/JCI11405
16. Emtage P.C., Lo A.S., Gomes E.M. et al. Second-generation anti-carcinoembryonic antigen designer T cells resist activation-induced cell death, proliferate on tumor contact, secrete cytokines, and exhibit superior antitumor activity in vivo: a preclinical evaluation. *Clin Cancer Res* 2008;14(24):8112–22. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4910
17. Wang X., Riviere I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol Ther Oncolytics* 2016;3:16015. DOI: 10.1038/mt.2016.15

Благодарность. Авторы выражают благодарность к.м.н., директору ООО «ХЕМА» Ю.С. Лебедину за предоставление клона мышиного антитела 3С1, специфичного к РЭА.

Acknowledgment. The authors express their gratitude to Yu.S. Lebedin, Ph.D., Director of HEMA LLC, for providing a clone of the 3C1 mouse antibody specific to CEA.

Вклад авторов

В.К. Боженко: разработка концепции и дизайна исследования, научное консультирование, окончательное утверждение версии статьи;
А.М. Шишкин: оптимизация методов, проведение исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка чернового варианта статьи;
А.Н. Шкопоров: разработка CAR, оптимизация методов, проведение исследования, анализ и интерпретация данных;
Я.Ю. Киселева: написание текста статьи, редактирование;
Т.М. Кулинич: цитофлуориметрический анализ смывов с брюшной полости мышей;
Е.А. Кудинова: подбор доноров для получения лимфоцитов, анализ научной литературы по теме статьи, редактирование;
О.Б. Большакова: подготовка иллюстративного материала, анализ научной литературы по теме статьи;
В.А. Солодкий: научное консультирование, окончательное утверждение версии статьи.

Authors' contribution

V.K. Bozhenko: development of the concept and design of the study, scientific consultation, final approval of the version of the article;
A.M. Shishkin: optimization of methods, research, analysis and interpretation of data, preparation of a draft version of the article;
A.N. Shkoporov: CAR development, optimization of methods, research, data analysis and interpretation;
Y.Y. Kiseleva: article writing, editing;
T.M. Kulinich: cytofluorimetric analysis of washes from the abdominal cavity of mice;
E.A. Kudinova: selection of donors for obtaining lymphocytes, analysis of scientific literature on the topic of the article, editing;
O.B. Bolshakova: preparation of illustrative material, analysis of scientific literature on the topic of the article;
V.A. Solodky: scientific consulting, in the final approval of the version of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.К. Боженко / V.K. Bozhenko: <https://orcid.org/0000-0001-8351-8152>
А.М. Шишкин / A.M. Shishkin: <https://orcid.org/0000-0002-8934-2845>
А.Н. Шкопоров / A.N. Shkoporov: <https://orcid.org/0000-0002-5547-8672>
Я.Ю. Киселева / Y.Yu. Kiseleva: <https://orcid.org/0000-0002-8352-4787>
Т.М. Кулинич / T.M. Kulinich: <https://orcid.org/0000-0003-2331-5753>
О.Б. Большакова / O.B. Bolshakova: <https://orcid.org/0000-0001-8382-3579>
Е.А. Кудинова / E.A. Kudinova: <https://orcid.org/0000-0002-5530-0591>
В.А. Солодкий / V.A. Solodky: <https://orcid.org/0000-0002-1641-6452>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Минобрнауки России (проект #14.N08.11.0018).

Funding. The study was carried out with the support of the Ministry of Education and Science of Russia (project #14.N08.11.0018).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (9-го пересмотра, 2013 г.) и этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Протоколы исследования одобрены локальным этическим комитетом и этической комиссией ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России (протоколы № 9 от 27.09.2013 и № 2/14-Э от 17.02.2014).

Доноры подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study was carried out in accordance with the Helsinki Declaration of 1964 (9th revision, 2013) and the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Research and Other Scientific Purposes. The protocol of the study was approved by the local ethics committee and ethics commission of Russian Scientific Center of Radiology, Ministry of Health of the Russia (protocols No. 9 of 27.09.2013 and No. 2/14-E dated 17.02.2014).

Donors signed an informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 18.11.2022. **Принята к публикации:** 20.02.2023.

Article submitted: 18.11.2022. **Accepted for publication:** 20.02.2023.