

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

## EXPERIMENTAL STUDIES

### Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор и технология CAR-T при солидных опухолях в эксперименте

### Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and CAR-T Technology for Solid Tumors in Experiment

*Д.В. Зайцев<sup>1</sup>, Е.К. Зайкова<sup>1,2</sup>, А.С. Головкин<sup>1</sup>,  
Э.Р. Булатов<sup>3</sup>, А.Х. Валиуллина<sup>3</sup>, Р.М. Миргаязова<sup>3</sup>,  
А.А. Дакс<sup>2</sup>, А.Ю. Зарицкий<sup>1</sup>, А.В. Петухов<sup>1,2</sup>*

*DV Zaytsev<sup>1</sup>, EK Zaikova<sup>1,2</sup>, AS Golovkin<sup>1</sup>,  
ER Bulatov<sup>3</sup>, AKh Valiullina<sup>3</sup>, RM Mirgayazova<sup>3</sup>, AA Daks<sup>2</sup>,  
AYu Zaritskey<sup>1</sup>, AV Petukhov<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России,  
ул. Акkuratова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341

<sup>1</sup> VA Almazov National Medical Research Center,  
2 Akkuratova str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт цитологии РАН», Тихорецкий пр-т, д. 4,  
Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194064

<sup>2</sup> Institute of Cytology, 4 Tikhoretskii pr-t, Saint Petersburg,  
Russian Federation, 194064

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,  
ул. Кремлевская, д. 18, Казань, Российская Федерация, 420008

<sup>3</sup> Kazan (Privolzhskii) Federal University, 18 Kremlevskaya str., Kazan,  
Russian Federation, 420008

#### РЕФЕРАТ

#### ABSTRACT

**Актуальность.** Цитокины являются важными факторами, способствующими повышению эффективности CAR T-клеточной терапии. Кроме того, это ключевые элементы патогенеза синдрома высвобождения цитокинов и нейротоксичности при использовании технологии CAR-T. Однако в настоящее время эффекты цитокинов в контексте CAR T-терапии изучены недостаточно.

**Background.** Cytokines are considered as important factors that enhance the efficacy of CAR-T cell therapy. Besides, they are key elements of the pathogenesis of cytokine release syndrome and neurotoxicity in applying the CAR-T technology. However, cytokine effects in the context of CAR-T therapy have not yet been properly studied.

**Цель.** Проведение количественной оценки секреции цитокинов методом мультиплексного анализа при совместной инкубации CAR T-лимфоцитов анти-CD19 с эпителиальными клетками линий HeLa и A431, экспрессирующими на своей поверхности CD19.

**Aim.** To quantitatively assess cytokine secretion using multiplex assay with co-incubation of anti-CD19 CAR-T lymphocytes with epithelial HeLa and A431 cell lines expressing CD19 on their surface.

**Материалы и методы.** T-лимфоциты подвергнуты трансдукции лентивирусным вектором, содержащим ген анти-CD19-CAR. Экспрессия CAR проверена по репортеру GFP методом проточной цитометрии. С целью подтвердить специфическую активацию CAR T-клеток в ответ на опухолевый антиген проведен иммуноферментный анализ на определение уровня интерлейкина-2, интерферона-γ и фактора некроза опухолей-α. Цитотоксическая активность полученных CAR T-лимфоцитов изучалась при их прямом совместном культивировании с клетками-мишенями. Сравнение уровня цитокинов, выделенных до и после инкубации мишеней с CAR T-клетками, выполнено методом мультиплексного анализа.

**Materials & Methods.** T-lymphocytes were transduced with the lentiviral vector containing anti-CD19-CAR gene. CAR expression was tested based on GFP reporter using flow cytometry. To confirm a specific CAR-T cell activation response to tumor antigen, the levels of interleukin-2, interferon-γ, and tumor necrosis factor-α were measured by means of immunoassay. Cytotoxic activity of CAR-T lymphocytes obtained was examined with their direct co-culturing with target cells. The levels of cytokines isolated prior to and after incubation of targets with CAR-T cells were compared using multiplex assay.

**Результаты.** Отмечено повышение уровня провоспалительных цитокинов (интерлейкина-6, интерлейкина-1β, интерферона-γ) ( $p < 0,01$ ). Разница в уровне противовоспалительных цитокинов (интерлейкина-4, интерлейкина-10) оказалась незначительной, а в эксперименте на клеточной линии HeLa — статистически незначимой

**Results.** The level of some proinflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1β, interferon-γ) ( $p < 0.01$ ) increased. The difference in the levels of anti-inflammatory cytokines (interleukin-4, interleukin-10) was inconsiderable, and in the HeLa cell line experiment it was insignificant ( $p > 0.05$ ). The concentration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) was many times higher after incubation with CAR-T lymphocytes ( $p < 0.01$ ).

**Conclusion.** The trial revealed multiple enhancement of GM-CSF, one of the key elements of the pathogenesis of cy-

( $p > 0,05$ ). Выявлено многократное увеличение концентрации гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) после инкубации с CAR T-лимфоцитами ( $p < 0,01$ ).

**Заключение.** Выявлено многократное повышение уровня ГМ-КСФ, являющегося одним из ключевых звеньев патогенеза синдрома высвобождения цитокинов и CAR T-ассоциированной нейротоксичности. Данные, полученные в дальнейших исследованиях ГМ-КСФ при использовании технологии CAR-T, могут привести к повышению эффективности CAR T-терапии при значимом снижении ее токсичности.

**Ключевые слова:** CAR T-клетки, ГМ-КСФ, цитокины, иммунотерапия.

**Получено:** 10 января 2020 г.

**Принято в печать:** 28 марта 2020 г.

*Для переписки:* Даниил Владиславович Зайцев, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341; тел.: +7(981)727-16-74; e-mail: zaicev\_daniil@mail.ru

*Для цитирования:* Зайцев Д.В., Зайкова Е.К., Головкин А.С. и др. Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор и технология CAR-T при солидных опухолях в эксперименте. Клиническая онкогематология. 2020;13(2):115–22.

DOI: 10.21320/2500-2139-2020-13-2-115-122

tokine release syndrome and CAR-T-associated neurotoxicity. The results of further studies of GM-CSF can contribute to improving the efficacy of CAR-T therapy with considerably lower toxicity.

**Keywords:** CAR-T cells, GM-CSF, cytokines, immunotherapy.

**Received:** January 10, 2020

**Accepted:** March 28, 2020

*For correspondence:* Daniil Vladislavovich Zaytsev, 2 Akkuratova str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341; Tel.: +7(981)727-16-74; e-mail: zaicev\_daniil@mail.ru

*For citation:* Zaytsev DV, Zaikova EK, Golovkin AS, et al. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and CAR-T Technology for Solid Tumors in Experiment. Clinical oncohematology. 2020;13(2):115–22 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2020-13-2-115-122

## ВВЕДЕНИЕ

Цитокины представляют собой белковые молекулы с молекулярной массой 6–70 кДа [1], секретируемые различными клетками и участвующие в процессах межклеточных взаимодействий и коммуникаций. Важным представляется тот факт, что один и тот же тип цитокинов может секретироваться различными по происхождению клетками, так же как и один цитокин может оказывать множество различных воздействий на разные типы клеток, т. е. обладать плейотропным свойством [2].

Известно, что цитокины являются важными регуляторами иммунного ответа и способны модифицировать противоопухолевый эффект клеток иммунной системы. Они принимают участие не только в регуляции естественного противоопухолевого иммунитета, но и оказывают влияние на эффективность иммунотерапии, в т. ч. адоптивной T-клеточной [3]. Однако в контексте терапии T-лимфоцитами с химерным антиген-рецептором (CAR-T) эффекты цитокинов в настоящее время изучены недостаточно [3].

Очевидна способность ряда цитокинов усиливать пролиферативную способность и цитотоксическую активность CAR T-лимфоцитов [4]. С другой стороны, именно цитокины являются главными факторами, ответственными за развитие иммунотоксичности, связанной с CAR T-терапией, главным образом в виде синдрома высвобождения цитокинов и нейротоксичности [5].

Проблема повышения эффективности при одновременном снижении токсичности приобретает

особое значение в CAR T-терапии солидных опухолей, при которых в отличие от гематологических опухолей до сих пор не отмечено значимых достижений [6]. Неудачи в CAR T-терапии солидных опухолей связаны со сложностью выбора таргетного антигена, трудностями доставки CAR T-клеток в опухолевый очаг, а также с опухолевым микроокружением, оказывающим значимое супрессивное действие на иммунные клетки. [7]. В такой ситуации цитокины могут служить факторами преодоления проблемы иммуносупрессии микроокружения солидных опухолей. Так, например, получены данные о повышении числа и активности иммунных клеток в опухолевых очагах при локальном применении интерлейкина-12 (ИЛ-12) [8], а также о повышении цитотоксической активности CAR T-клеток при добавлении ИЛ-15 и ИЛ-21 [3].

Кроме того, секреция цитокинов может служить одним из маркеров, характеризующих функциональную активность CAR T-клеток, а исследование уровня секреции цитокинов может косвенно отражать эффективность CAR T-лимфоцитов в отношении таргетных клеток-мишеней *in vitro* [9].

Для тестирования продукции цитокинов CAR T-клетками на доклиническом этапе разработки используются *in vitro* и *in vivo* модели взаимодействия опухоли и эффектора. В качестве *in vitro* модели может применяться опухолевая клеточная линия, экспрессирующая таргетный антиген. Такую линию принято называть мишенью или просто опухолью по отношению к CAR T-клеткам-эффекторам.

В качестве мишеней в данной работе были выбраны клеточные линии эпителиальных опухолей: аденокарциномы шейки матки HeLa [10] и эпидермо-

идного рака кожи A431 [11], прошедшие генетическую модификацию и экспрессирующие экзогенный (привнесенный) ген CD19, кодирующий соответствующую молекулу белка.

**Цель нашего эксперимента** — количественная оценка секреции цитокинов при совместной инкубации CAR T-лимфоцитов анти-CD19 с эпителиальными клетками линий HeLa и A431, экспрессирующими на своей поверхности CD19.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Культивирование клеточных линий

Клеточные линии HeLa, A431 и HEK293T культивировали в среде DMEM с глутамином («ПанЭко», Россия), дополненной 10%-й фетальной бычьей сывороткой (Hyclone, США), 100 ЕД/мл пеницилина, 100 мкг/мл стрептомицина. Указанные клеточные линии были любезно предоставлены лабораторией регуляции экспрессии генов Института цитологии РАН. Т-лимфоциты периферической крови человека культивировали в среде RPMI-1640 с глутамином («ПанЭко», Россия), дополненной 10%-й фетальной бычьей сывороткой (Hyclone, США) с добавлением 300 ед. акт./мл человеческого рекомбинантного ИЛ-2 («Биотех», Россия).

### Получение клеточных линий HeLa и A431, стабильно экспрессирующих CD19

Последовательность гена CD19 была амплифицирована с кДНК клеточной линии CLL-HG3 и клонирована в вектор pUltra-Hot, предоставленный д-ром Malcolm Moore [12] и используемый для последующей лентивирусной трансдукции клеточных линий HeLa и A431. В качестве отрицательного контроля вместо гена CD19 использовали ген рецептора LNGFR. Селекция проводилась инкубированием с пурамицином в концентрации 2 мкг/мл в течение 1 нед.

### Определение экспрессии антигена CD19

Наличие рецептора CD19 на трансдуцированных клетках линий HeLa и A431 оценивали методом проточной цитометрии на приборе Guava EasyCyte8 (Millipore, США) с применением антител против антигена CD19, конъюгированного с PE (BD Biosciences, США). В качестве контроля использовали нетрансдуцированные клетки, окрашенные человеческими анти-CD19-PE-антителами. Окраску проводили в соответствии с рекомендациями производителя.

### Выделение и активация Т-лимфоцитов

Т-лимфоциты выделяли из фракции мононуклеаров периферической крови здорового донора, полученных путем центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque («ПанЭко», Россия). Для этого кровь разбавляли равным объемом раствора DPBS («БиолоТ», Россия), затем наслаивали на раствор Ficoll-Paque и центрифугировали при 400 g в течение 40 мин при комнатной температуре. Отбирали фракцию мононуклеаров, дважды промывали раствором DPBS и ресуспендировали в среде. Т-лимфоциты выделяли и активировали с помощью Dynabeads Human T-activator CD3/CD28 (Invitrogen, США).

### Создание целевой лентивирусной плазмиды

Целевую плазмиду получали посредством клонирования кассеты CAR\_CD19-T2A-EGFP в лентивирусный вектор pLVT1 («Евроген», Россия) под контролем промотора EF-1a, обеспечивающего высокую и стабильную экспрессию в первичных Т-лимфоцитах [13]. Последовательность CAR была аналогична FMC63-28ZCAR [9] и уже использовалась нами в предыдущих исследованиях [14].

### Получение рекомбинантных псевдовиральных частиц

За день до трансфекции клетки HEK293T рассевали на 10-см пластиковые чашки Петри по  $2,5 \times 10^6$  клеток на чашку. По достижении 70%-й конфлюэнтности в пробирке смешивали 3 плазмиды (из расчета на одну 10-см чашку Петри): psPAX2 (9,75 мкг), pMD2.G (5,27 мкг), целевая лентивирусная плаزمида (15 мкг). К полученной смеси добавляли реагент для трансфекции PEI MAX (Sigma-Aldrich, США) в соотношении PEI/ДНК = 2:1 и перемешивали в мешалке Vortex. Трансфекционную смесь инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре, затем по каплям добавляли в чашку Петри с клетками HEK293T и 7 мл среды.

Утром среду меняли. Свежая среда содержала 2 ммоль/л бутирата натрия. Через 48 ч супернатант, содержащий вирусные частицы, был собран и сконцентрирован посредством центрифугирования в модулях «Амикон Ультра-15, 100 кДа» (Millipore, США).

### Трансдукция и экспансия Т-лимфоцитов

Через 48 ч после активации проводили лентивирусную трансдукцию путем добавления очищенных рекомбинантных вирусных частиц в количестве 50 MOI и 50 мг/мл протамина сульфата.

Экспансия CAR T-клеток проводилась в течение 5 дней. Экспрессия CAR T-клеток проверена по репортеру GFP (зеленый флуоресцентный белок) методом проточной цитометрии. Фенотипирование осуществляли на проточном лазерном цитометре Cytoflex S (Beckman Coulter, США).

Оценку результатов фенотипирования выполняли с помощью программного обеспечения Kaluza 2.0 (Beckman Coulter, США).

### Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ был проведен с помощью наборов «Интерлейкин-2-ИФА-БЕСТ», «Гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ» и «Альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя после 24-часовой совместной инкубации CAR T-клеток с клетками-мишенями в соотношении 1:1.

### Оценка цитотоксичности в режиме реального времени

Влияние CAR T-клеток (эффектора) на линию HeLa (мишень) оценивали на клеточном анализаторе xCelligence S16 (ACEA Biosciences, США). Таргетные клетки рассевали в количестве 5000 клеток на лунку планшета, инкубировали в течение 13 ч, после чего добавляли эффектор в соотношении мишень/эффектор, равном 2:1. По прошествии 35 ч совместной

инкубации останавливали эксперимент и анализировали полученные данные.

### Анализ выброса цитокинов

Уровень цитокинов в клеточных культурах определяли с помощью лазерного анализатора для мультиплексного анализа Bio-Plex® 200 (Bio-Rad, США) через 48 ч после добавления CAR T-клеток, следуя инструкциям производителя. Для количественного определения аналитов (цитокинов/хемокинов) использовалась панель Bio-Plex Pro Human Chemokine (40-Plex), позволяющая одновременно выявлять 40 цитокинов.

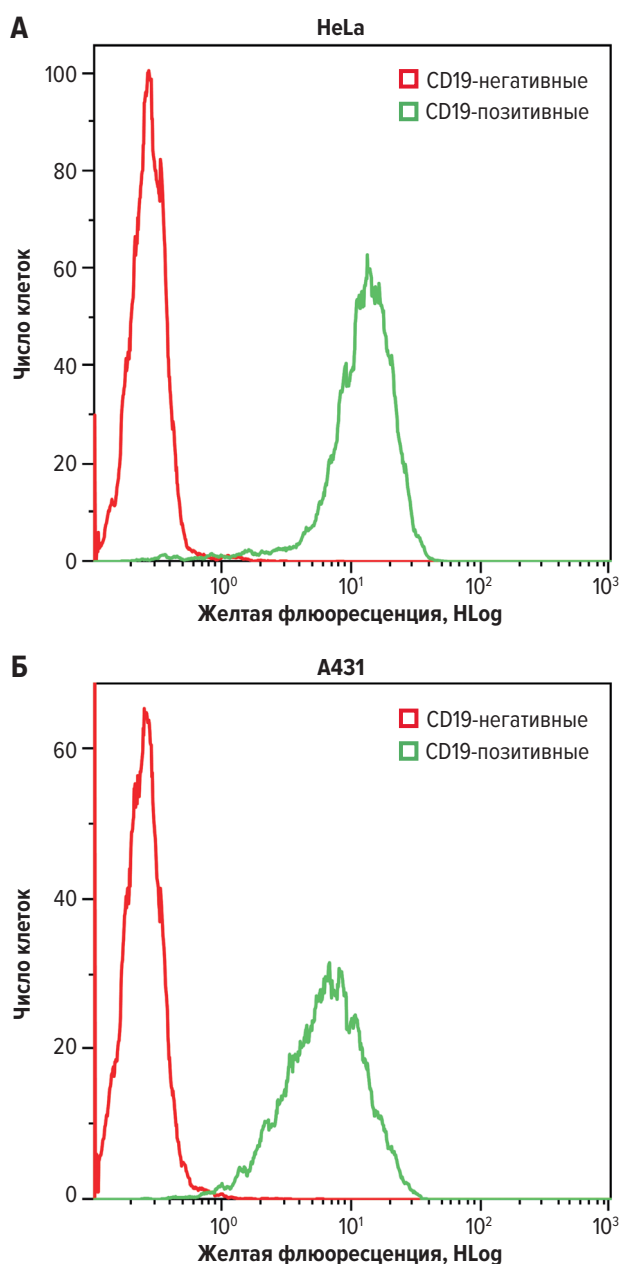
Образцы были проанализированы в трех повторях, калибровочные кривые для каждого аналита были получены с использованием стандартов, предоставленных производителем.

Результаты парных образцов (определение уровня цитокинов в клеточной линии после инкубации с CAR T-клетками и без таковой) сравнивали с использованием критерия Уилкоксона. Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета программ SPSS vi7.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

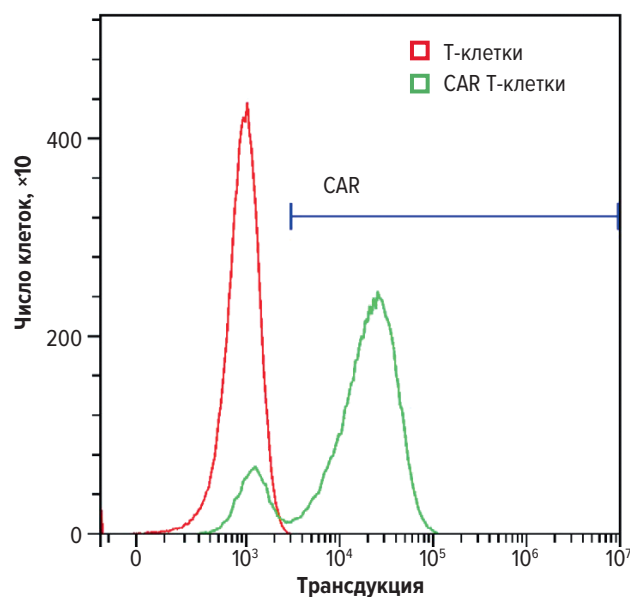
Наличие на поверхности трансдуцированных клеток-мишеней (HeLa и A431) экзогенного рецептора CD19 подтверждали методом проточной лазерной цитометрии (рис. 1).

Эффективность трансдукции Т-лимфоцитов составила 89,62 % по данным проточной цитометрии от-



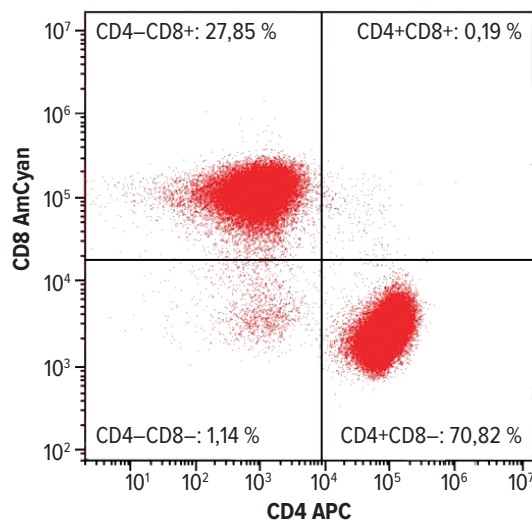
**Рис. 1.** (А, Б) Экспрессия CD19 в полученных клеточных линиях. Отсутствие экспрессии CD19 в нетрансдуцированных клеточных линиях

**Fig. 1.** (A, B) CD19 expression in the cell lines obtained. No CD19 expression in non-transduced cell lines



**Рис. 2.** Гистограмма эффективности трансдукции Т-лимфоцитов

**Fig. 2.** Histogram of T-lymphocyte transduction effectiveness



**Рис. 3.** Субпопуляции CAR T-клеток после трансдукции

**Fig. 3.** CAR-T subpopulations after transduction

носителем репортерного гена GFP (рис. 2). При этом среди прошедших трансдукцию и экспансию клеток почти все экспрессировали общий лейкоцитарный антиген CD45, из которых 97 % клеток были Т-лимфоцитами (положительными по CD3-антигену).

После экспансии оценивали фенотип CAR Т-клеток посредством окрашивания антителами против маркеров CD4 и CD8; соотношение CD4/CD8 составляло 2,5 (рис. 3).

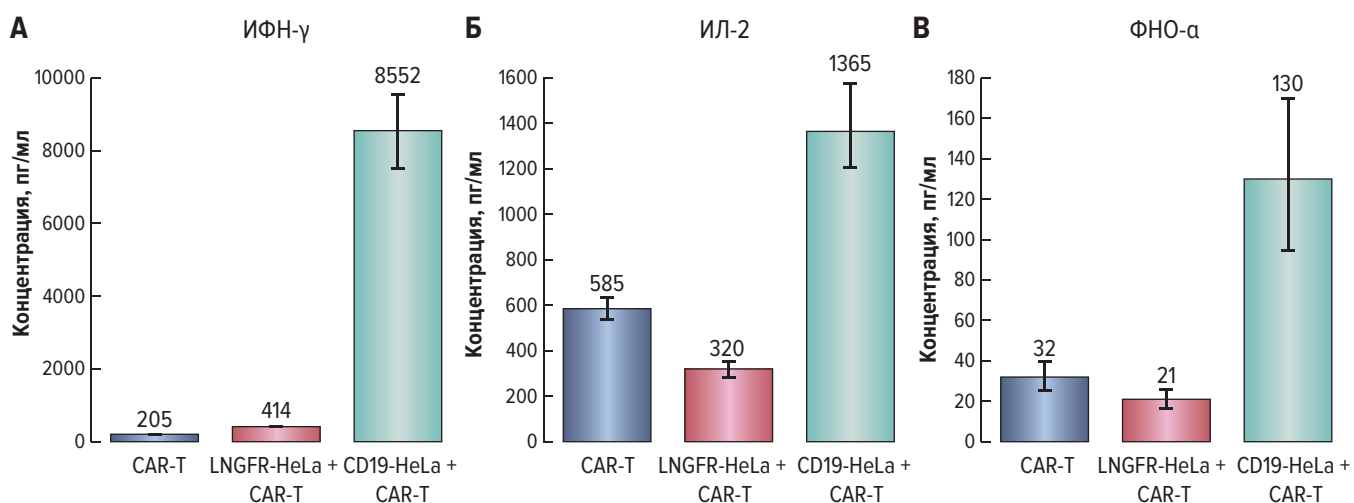
С целью подтвердить специфическую активацию CAR Т-клеток в ответ на экзогенный опухолевый антиген CD19 был проведен иммуноферментный анализ уровней ИЛ-2, интерферона-γ (ИФН-γ) и фактора некроза опухолей-α (рис. 4). Многократное повышение уровня указанных выше цитокинов в линии CD19-HeLa+, но не в линии LNGFR-HeLa+ (служащей отри-

цательным контролем) после совместной инкубации с CAR Т-клетками свидетельствует о специфическом противоопухолевом ответе активированных CAR Т-лимфоцитов.

Специфическую цитотоксичность CAR Т-лимфоцитов подтверждали также в режиме реального времени на приборе xCelligence. Регистрировали подавление роста и пролиферации CD19-позитивной линии (рис. 5).

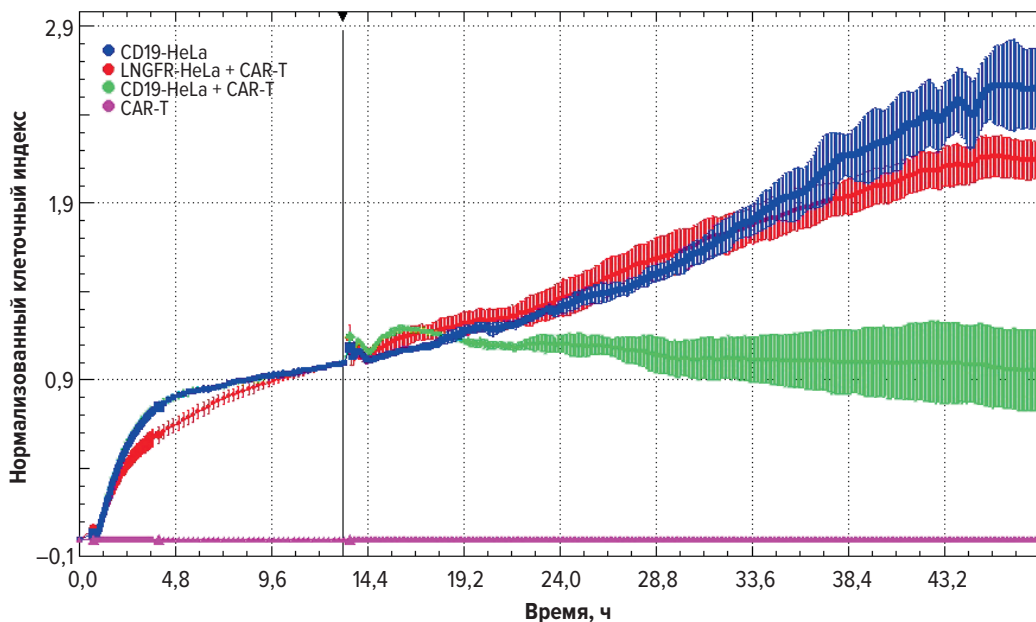
Для поиска сверхпродуцируемых CAR Т-клетками цитокинов, предположительно имеющих перспективное значение в клинической практике для оценки эффективности CAR Т-терапии, использовалась скрининговая мультиплексная панель.

В проведенном исследовании на клеточной линии HeLa отмечалось значимое повышение уровня провоспалительных цитокинов, а именно выявлено



**Рис. 4.** Изменение уровня (А) интерферона-γ (ИФН-γ), (Б) интерлейкина-2 (ИЛ-2) и (В) фактора некроза опухолей-α (ФНО-α) после добавления CAR Т-лимфоцитов к клеточным линиям, экспрессирующим специфический экзогенный опухолевый антиген CD19, выявленное методом иммуноферментного анализа

**Fig. 4.** Change in the levels of (A) interferon-γ (ИФН-γ), (Б) interleukin-2 (ИЛ-2), and (В) tumor necrosis factor-α (ФНО-α) after adding the CAR-T lymphocytes to the cell lines expressing CD19, the specific exogenous tumor antigen, identified by immunoassay

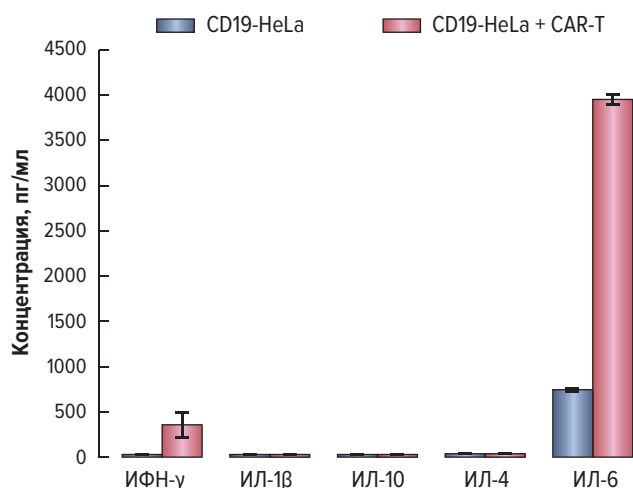


**Рис. 5.** График зависимости нормализованного клеточного индекса от времени

**Fig. 5.** Normalized cell index-time curve

повышение уровня ИЛ-6 в 5,4 раза ( $p < 0,01$ ), ИЛ-1 $\beta$  в 2,6 раза ( $p < 0,01$ ), ИФН- $\gamma$  в 18,9 раза ( $p < 0,01$ ). Уровень противовоспалительных цитокинов увеличился незначительно, разница в секреции цитокинов до и после добавления CAR T-клеток оказалась статистически незначима. Так, секреция ИЛ-4 и ИЛ-10 возросла в 1,1 и 1,9 раза соответственно ( $p > 0,05$ ) (рис. 6).

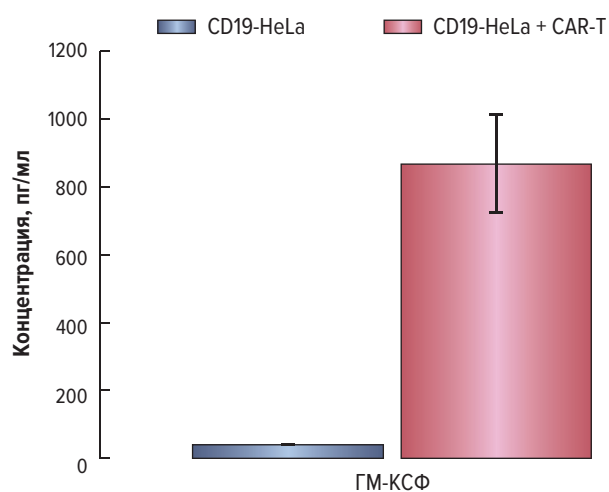
В ходе данного исследования отмечено многократное увеличение продукции гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). На линии HeLa уровень этого цитокина увеличился в 22,4 раза после добавления CAR T-клеток (рис. 7).



**Рис. 6.** Изменение уровня цитокинов на клеточной линии HeLa после инкубации с CAR T-лимфоцитами и без таковой, выявленное методом мультиплексного анализа  
ИЛ — интерлейкин; ИФН- $\gamma$  — интерферон- $\gamma$ .

**Fig. 6.** Change in the cytokine levels on the HeLa cell line after incubation with CAR-T lymphocytes and without it, identified by multiplex assay

ИЛ — interleukin; ИФН- $\gamma$  — interferon- $\gamma$ .

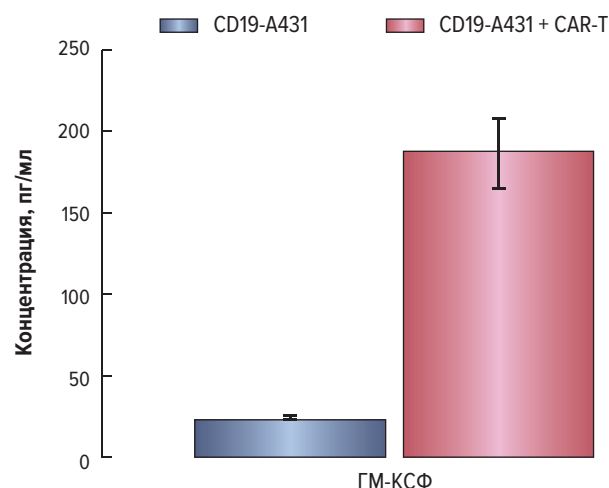


**Рис. 7.** Изменение уровня гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) на клеточной линии HeLa после инкубации с CAR T-лимфоцитами и без таковой

**Fig. 7.** Change in the levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (ГМ-КСФ) on the HeLa cell line after incubation with CAR-T lymphocytes and without it

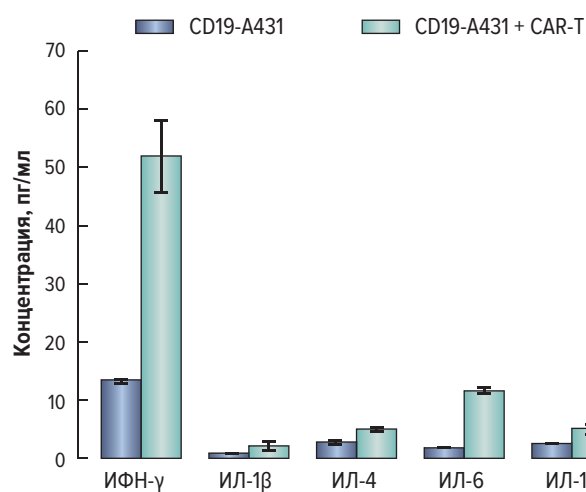
Для подтверждения полученных данных мы также провели инкубацию CAR T-клеток с CD19-позитивной линией A431 с последующим мультиплексным анализом, который также показал многократное увеличение уровня ГМ-КСФ в среде при добавлении CAR T-лимфоцитов. Уровень данного цитокина на опухолевой клеточной линии A431 увеличился в 7,6 раза ( $p < 0,01$ ) (рис. 8).

При этом в эксперименте на данной клеточной линии отмечается тенденция к изменению уровня цитокинов в целом, сходная с полученной на клеточной линии HeLa. Так, уровень ИЛ-6 повысился в 6,4 раза ( $p < 0,01$ ), ИЛ-1 $\beta$  — в 3,2 раза ( $p < 0,01$ ), ИФН- $\gamma$  —



**Рис. 8.** Изменение уровня гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) на клеточной линии A431 после инкубации с CAR T-лимфоцитами и без таковой

**Fig. 8.** Change in the levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (ГМ-КСФ) on the A431 cell line after incubation with CAR-T lymphocytes and without it



**Рис. 9.** Изменение уровня цитокинов на клеточной линии A431 после инкубации с CAR T-лимфоцитами и без таковой, выявленное методом мультиплексного анализа  
ИЛ — интерлейкин; ИФН- $\gamma$  — интерферон- $\gamma$ .

**Fig. 9.** Change in the cytokine levels on the A431 cell line after incubation with CAR-T lymphocytes and without it, identified by multiplex assay

ИЛ — interleukin; ИФН- $\gamma$  — interferon- $\gamma$ .

в 3,9 раза ( $p < 0,01$ ). Секреция ИЛ-4 и ИЛ-10 на клеточной линии A431 увеличилась всего в 1,8 и 2,1 раза соответственно ( $p < 0,01$ ) (рис. 9).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем экспериментальном исследовании продемонстрировано значимое увеличение секреции провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$ , ИФН- $\gamma$ ) в ответ на добавление в опухолевую клеточную линию CAR T-лимфоцитов анти-CD19.

Как известно, секреция провоспалительных цитокинов является ключевым элементом в запуске и поддержании одного из главных угрожающих жизни осложнений CAR T-терапии — синдрома высвобождения цитокинов (СВЦ) [15]. Одним из основных цитокинов, ответственных за развитие СВЦ, является ИЛ-6. Блокада рецептора ИЛ-6 в клинической практике приводит к значительному снижению частоты возникновения и интенсивности проявлений синдрома [16]. Имеются сведения о существенном вкладе и ИЛ-1 в развитие СВЦ [17]. Используемые в настоящее время лечебные подходы (применение моноклональных антител к ИЛ-6, ИЛ-1 и их рецепторам, глюкокортикоидов) обуславливают дополнительную токсичность терапии [18], а в ряде случаев они не способны предотвратить развитие развернутых форм СВЦ или тяжелых проявлений нейротоксичности и связанной с ними летальности [19, 20].

С другой стороны, к настоящему времени получены достаточные экспериментальные данные о влиянии на развитие СВЦ, другого, ранее не имевшего заслуженного внимания цитокина — ГМ-КСФ [21, 22]. Важно отметить, что в проведенном нами эксперименте отмечено многократное (в 7,6 и 22,4 раза на модифицированных опухолевых клеточных CD-позитивных линиях A431 и HeLa соответственно) повышение уровня ГМ-КСФ при добавлении CAR T-лимфоцитов анти-CD19 в отсутствие клеток иного происхождения.

ГМ-КСФ представляет собой провоспалительный цитокин, принимающий участие в созревании и активации миелоидных клеток [23]. Роль ГМ-КСФ в патогенезе воспаления доказана для ряда воспалительных и аутоиммунных заболеваний [24]. Секреция данного цитокина может активировать миелоидные клетки *in vivo*, увеличивая тем самым системную иммунотоксичность [23]. Важным является и тот факт, что рецептор ГМ-КСФ высоко экспрессируется на клетках центральной нервной системы, а именно клетках микроглии, астроцитах, макрофагах, расположенных в головном мозге [25]. В одном из исследований показано, что более 80 % активированных CD4-позитивных CAR T-клеток экспрессируют ген *CSF2*, кодирующий ГМ-КСФ, однако точный механизм, объясняющий преобладание CAR T-клеток с ГМ-КСФ-положительным фенотипом, до сих пор остается не до конца ясным [26].

Было показано, что ГМ-КСФ может продуцироваться непосредственно активированными CAR T-лимфоцитами [21] в отличие, например, от ИЛ-6 и ИЛ-1, секретируемых преимущественно клетками миелоидного происхождения [17, 27]. Повышение уровня

ГМ-КСФ наблюдалось уже менее чем через 4 ч после инкубации на опухолевой клеточной линии с CAR T-клетками. Это представляется фактором, способствующим секреции других провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-6, которые служат маркерами СВЦ [21]. Так, при добавлении ГМ-КСФ к CAR T-клеткам концентрация ИЛ-6 значимо возрастала. Напротив, при нейтрализации данного цитокина или блокировании рецептора ГМ-КСФ специфическими моноклональными антителами происходило ингибирование секреции ИЛ-6 [21]. Кроме того, показано, что нейтрализация ГМ-КСФ также приводила к снижению уровня таких провоспалительных цитокинов, как MCP-1 и ИЛ-8, и не оказывала значимого влияния на уровень фактора некроза опухолей- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$  и ИЛ-10 [21]. Отмечается, что TALEN-опосредованная инактивация ГМ-КСФ в CAR T-лимфоцитах снижает секрецию ИЛ-6 клетками миелоидного происхождения и при этом не оказывает влияния на пролиферацию, активацию и эффективность CAR T-лимфоцитов [21]. Помимо этого, согласно одному исследованию, проведенному на ксеномодели острого лимфобластного лейкоза, нейтрализация ГМ-КСФ приводит к снижению CAR-T-опосредованной нейротоксичности, а применение CAR T-клеток анти-CD19, нокаутных по ГМ-КСФ, позволяет предотвратить такие проявления СВЦ, как потеря массы тела и энцефалопатия [22]. Авторы показали увеличение общей выживаемости у мышей с NALM6-клетками, получавших терапию CAR T-клетками анти-CD19, нокаутными по ГМ-КСФ. Нейтрализация ГМ-КСФ с помощью специфического моноклонального антитела ленилумаба привела к повышению пролиферативной способности и функциональной активности CAR T-клеток, а использование ГМ-КСФ-дефицитных CAR T-клеток продемонстрировало увеличение общей выживаемости в сравнении с применением ГМ-КСФ-недефицитных CAR T-лимфоцитов [22]. Таким образом, данный цитокин представляет собой большой интерес для оценки активности CAR T-клеток как *in vitro*, так и в клинической практике в качестве раннего маркера СВЦ и как потенциальная мишень, воздействуя на которую можно добиться значимого снижения токсичности и повышения эффективности CAR T-терапии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Были получены CAR T-лимфоциты анти-CD19 с достаточной работоспособностью. Показано увеличение концентрации преимущественно провоспалительных цитокинов в отсутствие значимого повышения противовоспалительных цитокинов в ответ на добавление к CD19-позитивным клеточным эпителиальным линиям полученных CAR T-лимфоцитов анти-CD19. Выявлено многократное повышение уровня ГМ-КСФ, служащего одним из ключевых звеньев патогенеза СВЦ и CAR T-ассоциированной нейротоксичности.

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00049 и гранта РНФ № 19-75-10059.

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Концепция и дизайн:** Д.В. Зайцев, А.В. Петухов.

**Сбор и обработка данных:** Д.В. Зайцев, Е.К. Зайкова, А.В. Петухов, А.А. Дакс.

**Анализ и интерпретация данных:** Д.В. Зайцев, Е.К. Зайкова, А.В. Петухов.

**Подготовка рукописи:** Д.В. Зайцев, Е.К. Зайкова.

**Предоставление материалов исследования:** Е.К. Зайкова, А.В. Петухов, А.С. Головкин, Э.Р. Булатов, А.Х. Валиуллина, Р.М. Миргаязова.

**Окончательное одобрение рукописи:** А.В. Петухов, А.Ю. Зарицкий.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Stenken JA, Poschenrieder AJ. Bioanalytical Chemistry of Cytokines – a review. *Analyt Chim Acta*. 2015;853:95–115. doi: 10.1016/j.aca.2014.10.009.
2. Zhang JM, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007;45(2):27–37. doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e.
3. 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.
4. DeRenzo C, Gottschalk S. Genetic Modification Strategies to Enhance CAR T Cell Persistence for Patients With Solid Tumors. *Front Immunol*. 2019;10:218. doi: 10.3389/fimmu.2019.00218.
5. Shimabukuro-Vornhagen A, Godel P, Subklewe M, et al. Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):56. doi: 10.1186/s40425-018-0343-9.
6. Schmidts A, Maus MV. Making CAR T Cells a Solid Option for Solid Tumors. *Front Immunol*. 2018;9:2593. doi: 10.3389/fimmu.2018.02593.
7. Martinez M, Moon EK. CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 2019;10:128. doi: 10.3389/fimmu.2019.00128.
8. Chinnasamy D, Yu Z, Kerker SP, et al. Local delivery of interleukin-12 using T cells targeting VEGF receptor-2 eradicates multiple vascularized tumors in mice. *Clin Cancer Res*. 2012;18(6):1672–83. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3050.
9. Kochenderfer JN, Feldman SA, Zhao Y, et al. Construction and Preclinical Evaluation of an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor. *J Immunother*. 2009;32(7):689–702. doi: 10.1097/cji.0b013e3181ac6138.
10. Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):315–9. doi: 10.1038/nrc775.

11. Bortolomai I, Canevari S, Facetti I, et al. Tumor initiating cells: Development and critical characterization of a model derived from the A431 carcinoma cell line forming spheres in suspension. *Cell Cycle*. 2010;9(6):1194–206. doi: 10.4161/cc.9.6.11108.

12. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Meth*. 2014;11(8):783–4. doi: 10.1038/nmeth.3047.

13. Milone M, Fish J, Carpenito C, et al. Chimeric Receptors Containing CD137 Signal Transduction Domains Mediate Enhanced Survival of T Cells and Increased Antileukemic Efficacy In Vivo. *Mol Ther*. 2009;17(8):1453–64. doi: 10.1038/mt.2009.83.

14. Петухов А.В., Маркова В.А., Моторин Д.В. и др. Получение CAR T-лимфоцитов, специфичных к CD19, и оценка их функциональной активности in vitro. *Клиническая онкогематология*. 2018;11(1):1–9. doi: 10.21320/2500-2139-2018-11-1-1-9.

[Petukhov AV, Markova VA, Motorin DV, et al. Manufacturing of CD19 Specific CAR T-Cells and Evaluation of their Functional Activity in Vitro. *Clinical oncohematology*. 2018;11(1):1–9. doi: 10.21320/2500-2139-2018-11-1-1-9. (In Russ)]

15. Yanez L, Sanchez-Escamilla M, Perales MA. CAR T Cell Toxicity: Current Management and Future Directions. *HemaSphere*. 2019;3(2):e186. doi: 10.1097/HS9.0000000000000186.

16. Barrett DM, Teachey DT, Grupp SA. Toxicity management for patients receiving novel T-cell engaging therapies. *Curr Opin Pediatr*. 2014;26(1):43–9. doi: 10.1097/MOP.0000000000000043.

17. Giavridis T, van der Stegen SJC, Eyquem J, et al. CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade. *Nat Med*. 2018;24(6):731–8. doi: 10.1038/s41591-018-0041-7.

18. Jones G, Ding C. Tocilizumab: A review of its safety and efficacy in rheumatoid arthritis. *Clin Med Ins Arthrit Musculoskel Dis*. 2010;3:81–9. doi: 10.4137/cmamd.s4864.

19. Davila ML, Riviere I, Wang X, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Mol Ther*. 2014;22:s295–s296. doi: 10.1016/s1525-0016(16)35779-3.

20. Hunter BD, Jacobson CA. CAR T-cell associated neurotoxicity: Mechanisms, clinicopathologic correlates, and future directions. *J Nat Cancer Inst*. 2019;111(7):646–54. doi: 10.1093/jnci/djz017.

21. Sachdeva M, Duchateau P, Depil S, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inactivation in CAR T-cells prevents monocyte-dependent release of key cytokine release syndrome mediators. *J Biol Chem*. 2019;294(14):5430–7. doi: 10.1074/jbc.AC119.007558.

22. Sterner RM, Sakemura R, Cox M, et al. GM-CSF inhibition reduces cytokine release syndrome and neuroinflammation but enhances CAR-T cell function in xenografts. *Blood*. 2019;133(7):697–709. doi: 10.1182/blood-2018-10-881722.

23. Becher B, Tugues S, Greter M. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity*. 2016;45(5):963–73. doi: 10.1016/j.immuni.2016.10.026.

24. Wright HL, Bucknall RC, Moots RJ, et al. Analysis of SF and plasma cytokines provides insights into the mechanisms of inflammatory arthritis and may predict response to therapy. *Rheumatology*. 2012;51(3):451–9. doi: 10.1093/rheumatology/ker338.

25. Donatien P, Anand U, Yiangou Y, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor expression in clinical pain disorder tissues and role in neuronal sensitization. *Pain Rep*. 2018;3(5):e676. doi: 10.1097/PR9.0000000000000676.

26. Xhangolli I, Dura B, Lee G, et al. Single-cell Analysis of CAR-T Cell Activation Reveals A Mixed TH1/TH2 Response Independent of Differentiation. *Genom Proteom Bioinform*. 2019;17(2):129–39. doi: 10.1016/j.gpb.2019.03.002.

27. Singh N, Hofmann TJ, Gershenson Z, et al. Monocyte lineage-derived IL-6 does not affect chimeric antigen receptor T-cell function. *Cytherapy*. 2017;19(7):867–80. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.04.001.