

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 571.27

doi: 10.26907/2542-064X.2022.2.212-230

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ CAR-T-КЛЕТОК ПРОТИВ МОДЕЛИ КАРЦИНОМЫ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

*А.Х. Валиуллина¹, Е.А. Змиевская¹, А.Р. Рахматуллина¹, М.Н. Журавлева¹,
Е.Е. Гаранина¹, Р.Р. Мифтахова¹, А.В. Петухов², А.А. Ризванов¹,
Э.Р. Булатов¹*

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

²ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России,
г. Санкт-Петербург, 197341, Россия

Аннотация

В последние годы adoptивная клеточная терапия (АКТ) получила новую перспективу применения благодаря развитию технологий и успешному клиническому применению Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR-T) для лечения пациентов со злокачественными В-клеточными новообразованиями. В работе получены CAR-T-клетки с химерным антигенным рецептором 2-го поколения FMC63-28Z-CAR. Оценена эффективность применения полученных CAR-T-клеток против монослоя модифицированной клеточной линии карциномы предстательной железы PC-3M(Kat⁺CD19⁺). Продемонстрирована корреляция между повышением секреции провоспалительных цитокинов IFN γ , TNF α , IL6 и снижением конfluenceнтности монослоя опухолевых клеток. При этом выраженный противоопухолевый эффект CAR-T-клеток наблюдался начиная с 5-х суток коинкубации. Предложенный подход потенциально может быть применим для предварительной оценки эффективности биомедицинских CAR-T-клеточных продуктов при терапии солидных опухолей.

Ключевые слова: CAR-T-клетки, химерный антигенный рецептор, солидная опухоль, клеточная модель, карцинома предстательной железы, PC-3M

Введение

Химерный антигенный рецептор представляет собой рекомбинантный гибридный белок, содержащий внеклеточный домен одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) антитела, спейсерный и трансмембранный домены, а также цитоплазматический сигнальный домен, содержащий фрагмент CD3-зета цепи и, в случае химерных антигенных рецепторов второго поколения, костимулирующие фрагменты CD28, CD137, CD134 или RIAD [1–3]. Распознавание антигена-мишени происходит посредством поверхностного scFv-домена, что приводит к активации CAR-T-клеток независимым от главного комплекса гистосовместимости способом [4].

Поверхностный маркер CD19 является пан-В-клеточным антигеном и выступает в качестве диагностического биомаркера и мишени для иммунотерапии

различных лимфом [5]. Аутологичные CAR-T-клетки, специфически распознающие CD19-антиген, продемонстрировали высокую эффективность в 1-й фазе клинических исследований против резистентного В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ), хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) и неходжкинской лимфомы (НХЛ) [6–11]. При этом в случае терапии В-ОЛЛ удалось достичь высокого уровня ремиссии (70–94%) [6, 8, 12–14]. В клиническом испытании [15] анти-CD19 CAR-T-клетки использовались для терапии 68 детей с ОЛЛ, у 83% из которых наблюдалась полная ремиссия, а через 6 месяцев безрецидивная и общая выживаемость составили 75% и 89% соответственно. В другом исследовании [16], несмотря на обнадеживающие результаты иммунотерапии анти-CD19 CAR-T-клетками, у 45% пациентов с минимальным уровнем остаточного заболевания наблюдался рецидив, а у 39% пациентов с рецидивами обнаруживались CD19-негативные бластные клетки. CAR-T-клеточные препараты применяются и против других В-клеточных антигенов. Так, анти-BCMA (B-cell maturation antigen, антиген созревания В-клеток) CAR-T-клетки использовались для терапии множественной миеломы (ММ) и других миелоидных злокачественных новообразований [17]. В этом исследовании у 7 из 11 пациентов с рецидивирующей и рефрактерной ММ был показан 100% общий уровень ответа на лечение, у 2 пациентов отмечена полная ремиссия, а у других 2 наблюдалась минимальная остаточная болезнь. В другом клиническом исследовании 57 пациентов с рецидивирующей и рефрактерной ММ получали CAR-T-терапию, направленную против эпитопов BCMA и LCAR-V38M [18]. Общий уровень ответа на лечение составил 88%, а у 68% отмечалась минимальная остаточная болезнь при наблюдении в течение 8 месяцев.

Несмотря на существенный успех CAR-T-терапии при лечении В-клеточных злокачественных новообразований, крайне актуальным и до сих пор нерешенным остается вопрос об эффективном применении данного вида терапии против солидных опухолей. Это связано с рядом ключевых лимитирующих факторов, среди которых [19]:

- on-target off-tumor эффект, обусловленный возможностью экспрессии опухоль-специфических антигенов в здоровых тканях;
- отсутствие единого опухоль-ассоциированного антигена (ОАА) в большинстве опухолей;
- гетерогенная экспрессия таргетного антигена на опухолевых клетках, способная приводить к появлению и экспансии антиген-негативных вариантов опухоли;
- ограниченная жизнеспособность и пролиферация CAR-T-клеток в организме пациента после адоптивного переноса;
- ограниченная миграция CAR-T-клеток через опухолевую строму;
- низкая активность CAR-T-клеток в тканях солидной опухоли, связанная с отсутствием факторов роста лимфоцитов (например, IL-2, IL-15), присутствием регуляторных Т-клеток и клеток-супрессоров миелоидного происхождения, а также метаболически враждебным микроокружением опухоли.
- высокий риск развития осложнений, таких как синдром цитокинового шторма (СЦШ) и нейротоксичность (НТ).

Однако стоит отметить, что CAR-T-клетки, специфичные к ряду солидных опухолевых антигенов, все же показали обнадеживающие предварительные клинические результаты [20]. К данным антигенам относятся HER2 (человеческий эпидермальный фактор роста 2), GD2 (дизиаialogанглиозид), FAP (белок активации фибробластов), IGF-1R (рецептор инсулиноподобного фактора роста 1), ROR1 (орфаноподобный рецептор тирозинкиназы 1) [21]. Таким образом, разработка новых подходов для CAR-T-клеточной терапии солидных опухолей представляет собой актуальное и перспективное направление исследований.

В настоящей работе нами продемонстрирована эффективность CAR-T-клеток против *in vitro* модели карциномы предстательной железы, представляющей собой монослой модифицированных клеток PC-3M(Kat+CD19+). Оценен профиль секреции провоспалительных цитокинов, обуславливающих развитие СЦШ.

1. Материалы и методы

1.1. Создание лентивирусных конструкций. Для создания конструкции CD19-CAR-T-RIAD был использован лентивирусный вектор lentiCRISPRv2 (Addgene plasmid #52961), предоставленный Фэн Чжаном (Feng Zhang) (Институт Броуда при Массачусетском технологическом институте и Гарвардском университете, США). FMC63-28ZCAR был синтезирован в ООО «АТГ Сервис Ген» (г. Санкт-Петербург). Кассета CD19-CAR-T2A-GFP-RIAD состояла из генов, кодирующих анти-CD19-CAR, пептид T2A, репортерный белок GFP и пептид RIAD. Клонирование кассеты осуществлялось по сайтам рестрикции AgeI и MluI.

1.2. Получение CAR-T-клеток. Для получения лентивирусных частиц проводили трансфекцию плазмидной конструкции, кодирующей CAR-рецептор и репортерный белок GFP, в клетки HEK-293T на среде DMEM совместно с пакующей плазмидой psPax2 (кат. № 12260 Addgene, США) и оболочечной плазмидой pMD2.G (кат. № 12259 Addgene, США) с помощью трансфицирующего агента PEI MAX (Polysciences, США) [22]. После 12-часовой инкубации среду заменяли на свежую ростовую с добавлением 5% эмбриональной бычьей сыворотки, 5 ммоль бутирата натрия и инкубировали 28 ч. Содержащий вирусные частицы супернатант собирали и фильтровали с помощью стерильного мембранного фильтра с диаметром пор 0.45 мкм (Millipore, США). Концентрирование проводили с помощью центрифужного модуля Amicon Ultra-15 с отсечением 100 кДа (Millipore, США) при 3000 g в течение 30 мин.

Мононуклеарные клетки периферической крови условно здорового донора выделяли центрифугированием на градиенте раствора фиколла с плотностью 1.077 г/см³ (ПанЭко, Россия) и культивировали в количестве 1·10⁶ клеток/мл в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей L-глутамин (ПанЭко, Россия), пенициллин/стрептомицин (ПанЭко, Россия) и 10% бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США).

Для селекции и активации T-лимфоцитов применяли иммуномагнитные частицы Dynabeads Human T-activator CD3/CD28 (Invitrogen, США) в соотношении 2 частицы на 1 клетку. T-лимфоциты культивировали 48 ч в среде RPMI 1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Hyclone, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 300 ед./мл

рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 (IL-2) (СайСторЛаб, Россия). Затем Т-лимфоциты трансдуцировали лентивирусными частицами в условиях множественного заражения с использованием 50 мкг/мл раствора протамина сульфата (Sigma-Aldrich, США) и продолжали инкубировать в течение 72 ч. Эффективность лентивирусной трансдукции Т-лимфоцитов оценивали с помощью точной цитофлуориметрии путем количественной оценки GFP-положительных клеток, а также с помощью биотинилированного протеина L (ThermoFisher, США), связывающегося с легкой цепью IgG фрагмента CAR, и конъюгата стрептавидин-Pacific Blue (ThermoFisher, США).

1.3. Получение модифицированной клеточной линии PC-3M, экспрессирующей красный флуоресцентный белок Katushka2S и CD19-антиген.

1.3.1. Получение лентивирусных частиц. Клетки линии HEK-293T трансфицировали одновременно плазмидой, несущей трансген pKatushka2S (кат. № FP7626, Евроген, Россия), упаковочной плазмидой (psPax2, кат. № 12260 Addgene, США) и оболочечной плазмидой (pCMV-VSV-G, кат. № 8454, Addgene, США). Лентивирусные частицы собирали из супернатанта трансфицированных клеток и концентрировали в ультрацентрифуге Optima L-90K в пробирках Ultra-Clear Centrifuge Tubes 1×31/2 in. (25×89 мм) до конечного объема 2 мл. Концентрированные лентивирусные частицы переносили в пробирки и замораживали при -80°C .

1.3.2. Трансдукция опухолевых клеток. Клетки карциномы предстательной железы PC-3M рассеивали в 12-луночный планшет в количестве $6 \cdot 10^4$ клеток на лунку в 500 мкл среды DMEM. Клетки культивировали в инкубаторе в течение 16–20 ч. Далее для проведения трансдукции среду заменяли на содержащую вирус (150 мкл вируса, 350 мкл свежей среды DMEM для культивирования). Через 16 ч инкубации среду с лентивирусными частицами меняли на свежую ростовую среду. Эффективность трансдукции оценивали через 48 ч на точном цитофлуориметре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США) путем количественной оценки Kat^+ -клеток.

Полученную таким образом клеточную линию PC-3M(Kat^+) далее трансдуцировали лентивирусными частицами, кодирующими антиген CD19, аналогично вышеописанному способу. Эффективность трансдукции оценивали путем количественной оценки $\text{Kat}^+\text{CD19}^+$ -клеток с помощью антител anti-CD19-FITC (BioLegend, США).

1.4. Оценка эффективности действия CAR-T-клеток против опухолевых клеток. Оценку элиминации опухолевых клеток под действием CAR-T-клеток проводили путем их кокультивирования. Для этого контрольную линию PC-3M(Kat^+) и экспериментальную линию PC-3M($\text{Kat}^+\text{CD19}^+$) высевали на культуральный планшет в количестве $5 \cdot 10^4$ клеток на лунку. Через 12 ч добавляли CAR-T-клетки в количестве $1 \cdot 10^5$ клеток на лунку и продолжали инкубирование. Затем проводили динамическое наблюдение за культурами клеток с помощью конфокального сканирующего микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия). Проводили съемку не менее 6 репрезентативных микрофотографий образцов на 1-е, 3-е и 7-е сутки культивирования. Микрофотографии обрабатывали с помощью программного обеспечения ImageJ, а именно определяли процентное соотношение

площади, занятой клетками, экспрессирующими только красный флуоресцентный белок *Katushka* (Kat^+), и площади, занятой клетками, одновременно экспрессирующими красный флуоресцентный белок *Katushka* и антиген CD19 (Kat^+CD19^+), в процентном соотношении.

1.5. Мультиплексный анализ цитокинового профиля в супернатантах. Супернатанты, собранные после коинкубации CAR-T- и опухолевых клеток, использовали для проведения мультиплексного анализа секретированных цитокинов с помощью набора Bio-Plex Pro Human Cytokine Panel 17-plex Assay (Bio-Rad, США) на проточном лазерном анализаторе Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США).

1.6. Статистический анализ. Для определения статистической достоверности различий в конfluenceности монослоя на различные сутки культивирования использовали однофакторный дисперсионный анализ и программное обеспечение SPSS v17.0. Сравнение показателей конfluenceности проводили в каждой временной точке (ежедневно) при динамическом наблюдении на протяжении 7 дней.

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Создание конструкции CD19-CAR-T2A-GFP-RIAD. Получена целевая плазмидная конструкция размером 10137 п.н. для наработки эффекторных CAR-T-клеток, экспрессирующих рецептор к CD19-антигену. За основу был взят целевой лентивирусный плазмидный вектор lentiCRISPRv2 (Addgene plasmid #52961). В данный вектор были клонированы: последовательность рецептора к CD19-антигену, сшитая с CD3 ζ -сигнальным доменом корецепторного комплекса T-клеточного рецептора человека, последовательность белка EGFP, а также последовательность коактиваторного белка RIAD.

2.2. Оценка эффективности трансдукции T-лимфоцитов. Лентивирусная трансдукция T-лимфоцитов является распространенным методом доставки вектора и не оказывает существенного негативного влияния на жизнеспособность самих клеток. Эффективность трансдукции T-лимфоцитов лентивирусными частицами, оцененная по сигналу репортерного белка GFP с помощью метода проточной цитофлуориметрии, составила 86.98% (доля GFP-положительных клеток) (рис. 1, б). Эффективность трансдукции T-лимфоцитов, оцененная по уровню протеина L, составила 28.5% (рис. 1, в).

Разница в оценке эффективности трансдукции обусловлена тем, что протеин L представляет собой белок, который связывается с переменными легкими цепями (каппа-цепь) рецептора на поверхности CAR-T-клетки, тогда как GFP является внутриклеточным репортерным белком, бицистронно экспрессирующимся с CAR.

Кроме того, с помощью метода проточной цитофлуориметрии определяли процентное соотношение популяций CD4 $^+$ и CD8 $^+$ CAR-T-клеток, которое составило 5278% и 3925% соответственно (рис. 1, г).

Полученные результаты согласуются с известными данными [23], свидетельствующими, что для эффективной элиминации опухолевых клеток CAR-T-клеточный продукт должен содержать существенную популяцию клеток, стабильно

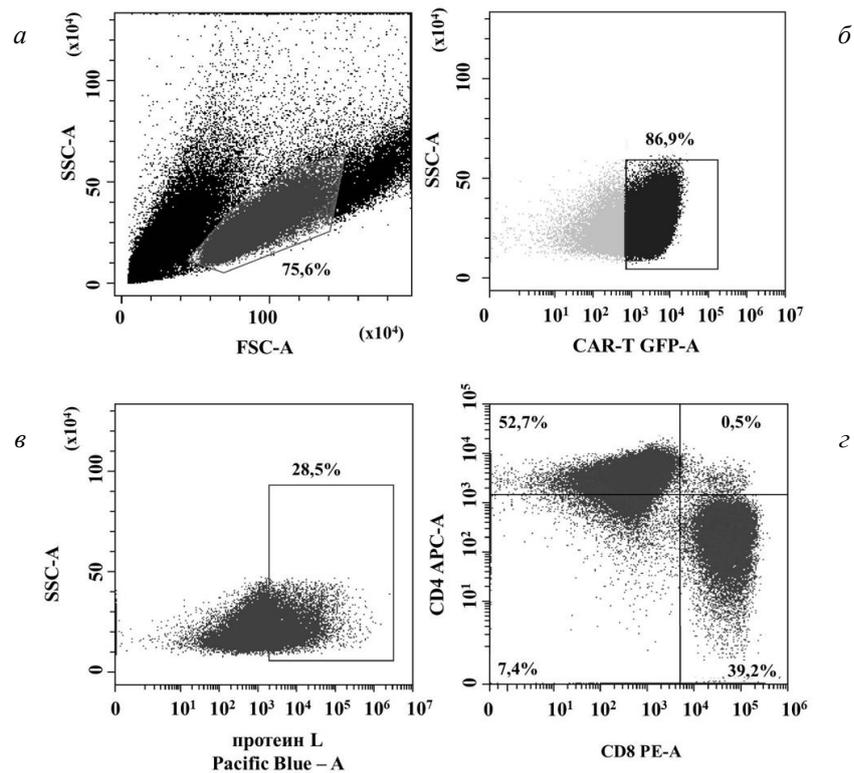


Рис. 1. Оценка эффективности трансдукции Т-лимфоцитов лентивирусными частицами: *a* – график распределения: популяция Т-клеток на графике прямого и бокового светорассеяния, выделена популяция Т-клеток; *б* – график распределения: популяция GFP-положительных Т-лимфоцитов (CAR-T-клетки); *в* – график распределения: оценка содержания CAR-T-клеток по уровню сигнала биотинилированного протеина L, связанного с конъюгатом стрептавидин-Pacific Blue; *г* – график распределения: субпопуляции CD4⁺ и CD8⁺ в общей популяции CAR-T-клеток. В левом верхнем квадрате представлена популяция CD4⁺ CAR-T-клеток, в правом нижнем квадрате представлена популяция CD8⁺ CAR-T-клеток

экспрессирующих трансген. При этом установлено, что именно CD8⁺ CAR-T-клетки вносят основной вклад в лизис опухолевых клеток-мишеней посредством перфорин-гранзимового механизма, а CD4⁺ CAR-T-клетки играют роль в регуляции функций ряда клеток иммунной системы, включая CD8⁺ CAR-T-клетки [24, 25].

2.3. Оценка эффективности трансдукции клеточной линии PC-3M лентивирусными частицами, кодирующими красный флуоресцентный белок *Katushka2S* и антиген CD19. Получение модифицированных клеток карциномы предстательной железы PC-3M(Kat⁺) и PC-3M(Kat⁺CD19⁺) путем трансдукции лентивирусных частиц, кодирующих красный флуоресцентный белок *Katushka2S* и антиген CD19, подтверждено методом проточной цитофлуориметрии. Эффективность трансдукции составила 83.24% (рис. 2, б) и 98.81% (рис. 2, г) для PC-3M(Kat⁺) и PC-3M(Kat⁺CD19⁺) соответственно.

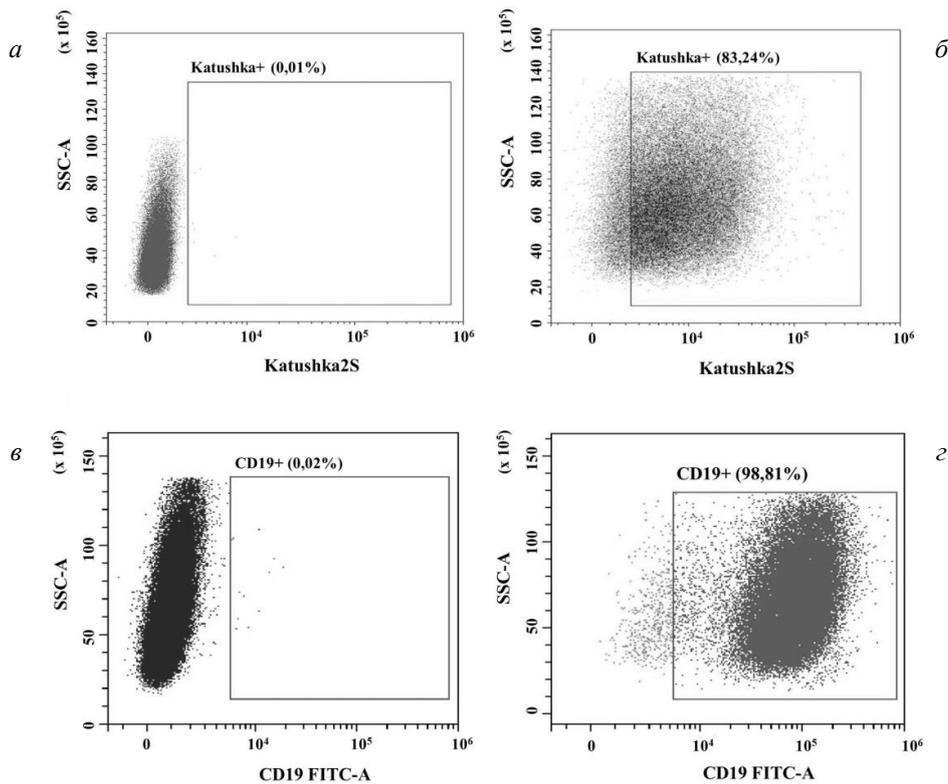


Рис. 2. Оценка эффективности трансдукции клеточной линии РС-3М лентивирусными частицами, кодирующими красный флуоресцентный белок Katushka2S и антиген CD19. *a* – график распределения: контрольная немодифицированная линия РС-3М; *б* – график распределения: уровень трансдукции клеток РС-3М лентивирусными частицами, кодирующими красный флуоресцентный белок Katushka2S; *в* – график распределения: контрольная немодифицированная линия РС-3М; *г* – график распределения: уровень трансдукции клеток РС-3М(Kat+) лентивирусными частицами, кодирующими антиген CD19

2.4. Оценка эффективности CAR-T-клеток против опухолевой линии РС-3М(Kat⁺CD19⁺). При динамическом наблюдении флуоресцентных микрофотографий и графическом анализе плотности монослоя клеток, несущих антиген CD19, было выявлено достоверное прогрессирующее снижение конfluenceности опухолевых клеток после добавления CAR-T-клеток ($p < 0.05$). Снижение конfluenceности клеточной линии РС-3М(Kat⁺CD19⁺) с 89% в 1-е сутки до нуля на 7-е сутки (рис. 3). При этом в плотности монослоя контрольных опухолевых клеток РС-3М(Kat⁺) после добавления CAR-T-клеток наблюдалось существенное снижение конfluenceности на 2-е и 4-е сутки с последующей пролиферацией монослоя практически до исходных значений на 7-е сутки. По-видимому, это может быть связано с частичным откреплением (но не с гибелью) контрольных опухолевых клеток в результате неспецифического взаимодействия с CAR-T-клетками.

Стоит подчеркнуть, что антиген CD19 не является классическим маркером рака предстательной железы. Несмотря на это, представленная модель может применяться для оценки действия CAR-T-клеток против модифицированных

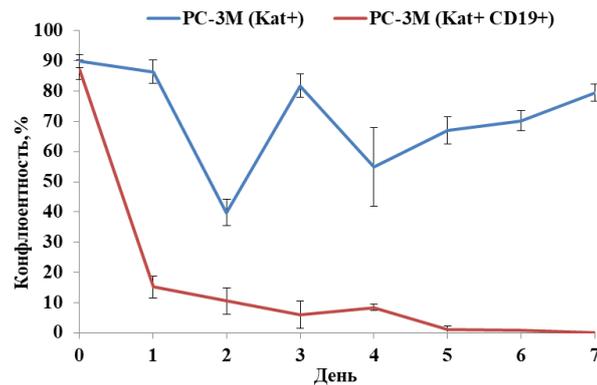


Рис. 3. Оценка эффективности CAR-T-клеток против опухолевой линии PC-3M(Kat⁺CD19⁺) при динамической оценке изменения конфлюентности с 1-го по 7-й день кокультивирования. Результаты представлены в виде среднего значения, планками погрешности обозначено стандартное отклонение ($n = 3$, $p < 0.05$)

солидных опухолевых линий. Это связано с тем, что пара «антиген – рецептор» CD19-CAR изучена наиболее хорошо и доказала свою простоту и эффективность на различных моделях *in vitro* и *in vivo*, а также обусловлено высокой эффективностью трансдукции, стабильностью экспрессии CAR и CD19 на поверхности соответствующих клеток и существенным цитотоксическим эффектом анти-CD19 CAR-T-клеток.

Полученные данные согласуются результатами исследования А. Петухова и др. [24], которые показали, что действие CAR-T-клеток приводит к снижению конфлюентности монослоя клеток миелогенного лейкоза K562(CD19⁺) до 9.3%. При этом для контрольных CD19-негативных клеток, конфлюентность практически не изменялась и составила 56.9%. Документирование динамики взаимодействия CAR-T- и опухолевых клеток проводили с помощью метода конфокальной флуоресцентной микроскопии на 1-й, 3-й, 7-й день кокультивирования (рис. 4). Полученные результаты согласуются с ожидаемым CAR-T-опосредованным цитолизом опухолевых клеток по гранзим-перфориновому механизму и свидетельствуют об эффективности действия CAR-T-клеток на исследуемую модель солидной опухоли предстательной железы.

2.5. Оценка цитокинового профиля супернатантов. Мультиплексный анализ цитокинового профиля в супернатантах, собранных после коинкубации CAR-T- и опухолевых клеток, выявил наибольшее изменение уровня IFN γ , TNF α , IL6 с максимумом на промежутке с 5-х по 7-е сутки (рис. 5). Отметим также, что секреция данных цитокинов *in vivo* у пациентов после введения CAR-T-клеточной терапии является одним из главных проявлений патогенеза СЦШ – тяжелого осложнения, способного привести к летальному исходу. СЦШ обусловлен гиперактивацией CAR-T-клеток и массивным неконтролируемым выбросом провоспалительных цитокинов [26], что в контексте проведенного исследования может свидетельствовать об антиген-опосредованной активации CAR-T-клеток и запуске механизмов клеточного иммунного ответа.

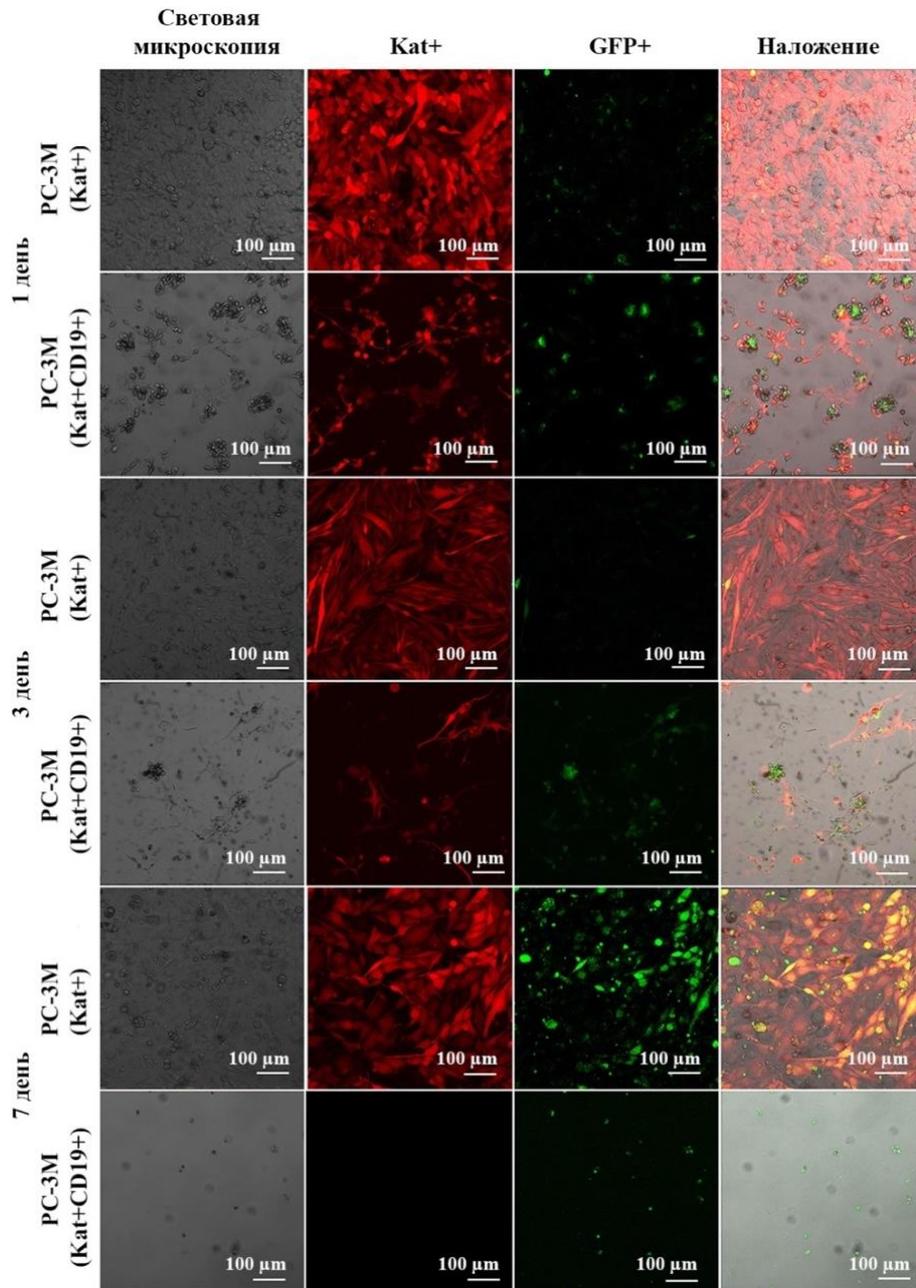


Рис. 4. Микрофотографии монослоя опухолевых клеточных линий PC-3M(Kat⁺) и PC-3M(Kat⁺CD19⁺) при кокультивировании с CAR-T-клетками. Световая микроскопия, флуоресцентная микроскопия, представлены репрезентативные микрофотографии ($n = 6$), масштабный отрезок – 100 мкм. CAR-T-клетки – зеленая флуоресценция. Опухолевые клетки PC-3M(Kat⁺) и PC-3M(Kat⁺CD19⁺) – красная флуоресценция

Полученные данные подтверждаются ранее опубликованными работами, где было показано, что анти-CD19 CAR-T-клетки секретируют широкий спектр цитокинов (включая IL1 β , IL6, IL8, IL10) при коинкубации с лимфобластоподобными клетками Raji(CD19+) [27].

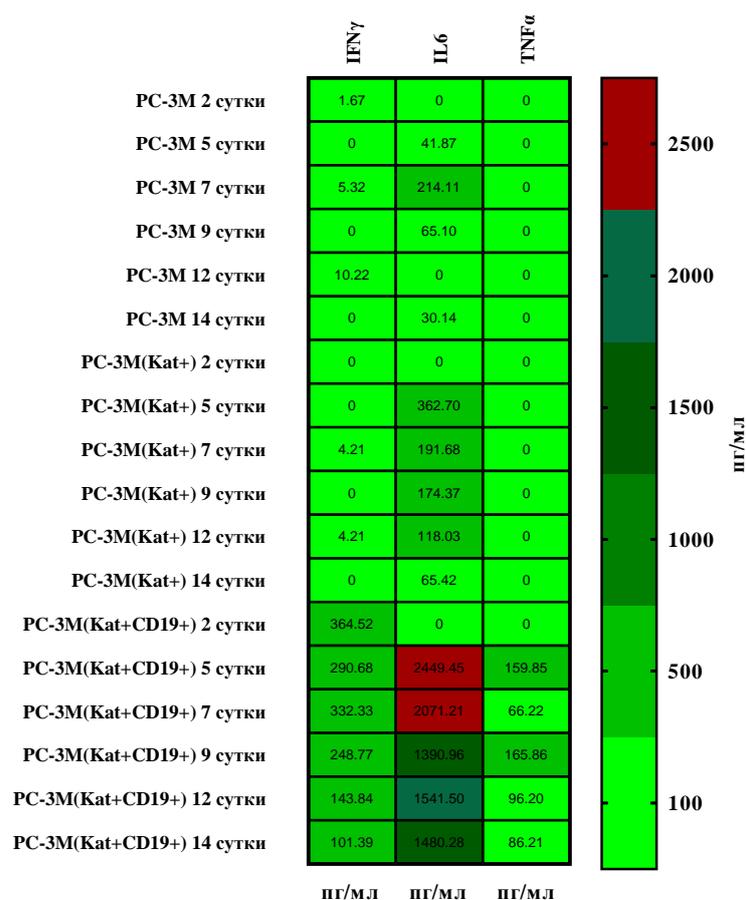


Рис. 5. Тепловая карта уровня экспрессии IFN γ , IL6, TNF α в культуральной среде при кокультивировании CAR-T-клеток с опухолевыми клеточными линиями PC-3M(Kat+) и PC-3M(Kat+CD19+) на разных временных точках

В полученных нами результатах прослеживается корреляция между повышением секреции провоспалительных цитокинов IFN γ , TNF α , IL6 и снижением конфлюентности монослоя опухолевых клеток, что продемонстрировано методами мультиплексного анализа и конфокальной микроскопии. При этом выраженный противоопухолевый эффект CAR-T-клеток наблюдался начиная с 5-х суток коинкубации. Интересно отметить, что, согласно данным [28], СЦШ также проявляется в течение первой недели после инфузии CAR-T-клеток пациенту и может продолжаться в течение последующих 1–2 недель.

Таким образом, использованный нами модельный подход потенциально может быть применим для предварительной оценки эффективности биомедицинских CAR-T-клеточных продуктов при терапии солидных опухолей. Предложенный в настоящей работе экспериментальный подход в будущем может позволить проведение прогностической оценки противоопухолевой эффективности CAR-T-препаратов с учетом различных уровней организации солидной опухолевой ткани. Целесообразным дальнейшим направлением развития данного исследования представляется последовательное усложнение опухолевых моделей и детальный

анализ действия CAR-T-клеток против клеточных сфероидов, опухолеподобных трехмерных структур и ксенографтных животных моделей.

Заключение

Адоптивная иммунотерапия представляет собой персонализированный вид клеточной иммунотерапии генетически-модифицированными Т-лимфоцитами, продемонстрировавшей значительный успех в терапии гематологических заболеваний.

Несмотря на клинический успех предлагаемой терапии для лечения лейкозов и лимфом, ряд существенных проблем пока не позволяет добиться стабильных положительных результатов применения CAR-T-терапии при прочих онкологических заболеваниях. Одним из недостатков подхода в его сегодняшнем виде является низкая эффективность против солидных опухолей. Исследования, направленные на понимание механизмов противоопухолевого клеточного ответа, повышение выживаемости CAR-T-клеток внутри опухолевого микроокружения, предотвращение опухолевого избегания путем потери экспрессии целевых антигенов, позволят расширить спектр терапевтического применения CAR-T-терапии для лечения солидных опухолей.

Важно также оценивать риски возникновения токсических побочных эффектов, например СЦШ, представляющего собой потенциально летальную реакцию иммунной системы пациента, вызванную резким высвобождением большого количества провоспалительных цитокинов. СЦШ является одним из наиболее часто встречающихся и опасных осложнений при CAR-T-клеточной терапии.

В работе продемонстрирована способность CAR-T-клеток к антиген-специфическому лизису модельной клеточной линии карциномы предстательной железы РС-3М(Kat⁺CD19⁺). Данные мультиплексного анализа цитокинового профиля в исследовании противоопухолевого действия CAR-T-клеток подтвердили риски возникновения СЦШ. В целом, полученные результаты указывают на потенциальную возможность применения данного типа терапии против солидных злокачественных новообразований. Представленные нами результаты будут полезными для оценки эффективности CAR-T-терапии, прогнозирования рисков развития побочной токсичности, а также для экстраполяции результатов *in vitro* анализа на дальнейшие доклинические и клинические исследования CAR-T-клеточных препаратов. Полученные результаты могут быть использованы для разработки новых иммунотерапевтических подходов и повышения эффективности других видов АКТ против солидных опухолей – в первую очередь опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов и TCR-T-клеток.

Благодарности. Работа выполнена за счет средств РНФ (проект № 19-74-20026), при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030). Расходные материалы (лабораторный пластик, интерлейкин-2) частично приобретены за счет средств совместного гранта РакФонда и ООО «СайСторЛаб».

Литература

1. *Eshhar Z.* The T-body approach: Redirecting T cells with antibody specificity // *Handbook of Experimental Pharmacology* / Ed. by Y. Chernajovsky, A. Nissim. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2008. – V. 181. – P. 329–342. – doi: 10.1007/978-3-540-73259-4_14.
2. *Curran K.J., Pegram H.J., Brentjens R.J.* Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: Current understanding and future directions // *J. Gene Med.* – 2012. – V. 14, No 6. – P. 405–415. – doi: 10.1002/jgm.2604.
3. *Dai H., Wang Y., Lu X., Han W.* Chimeric antigen receptors modified T-cells for cancer therapy // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2016. – V. 108, No 7. – Art. djv439, P. 1–14. – doi: 10.1093/jnci/djv439.
4. *Eshhar Z., Waks T., Gross G., Schindler D.G.* Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1993. – V. 90, No 2. – P. 720–724. – doi: 10.1073/pnas.90.2.720.
5. *Scheuermann R.H., Racila E.* CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy // *Leuk. Lymphoma.* – 1995. – V. 18, No 5–6. – P. 85–97. – doi: 10.3109/10428199509059636.
6. *Davila M.L., Riviere I., Wang X., Bartido S., Park J., Curran K., Chung S.S., Stefanski J., Borquez-Ojeda O., Olszewska M., Qu J., Wasielewska T., He Q., Fink M., Shinglot H., Youssif M., Satter M., Wang Y., Hosey J., Quintanilla H., Halton E., Bernal Y., Bouhassira D.C., Arcila M.E., Gonen M., Roboz G.J., Maslak P., Douer D., Frattini M.G., Giralt S., Sadelain M., Brentjens R.* Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia // *Sci. Transl. Med.* – 2014. – V. 6, No 224 – Art. 224ra25, P. 1–23. – doi: 10.1126/scitranslmed.3008226.
7. *Kochenderfer J.N., Dudley M.E., Kassim S.H., Somerville R.P., Carpenter R.O., Stetler-Stevenson M., Yang J.C., Phan G.Q., Hughes M.S., Sherry R.M., Raffeld M., Feldman S., Lu L., Li Y.F., Ngo L.T., Goy A., Feldman T., Spaner D.E., Wang M.L., Chen C.C., Kranick S.M., Nath A., Nathan D.A., Morton K.E., Toomey M.A., Rosenberg S.A.* Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor // *J. Clin. Oncol.* – 2015. – V. 33, No 6. – P. 540–549. – doi: 10.1200/JCO.2014.56.2025.
8. *Maude S.L., Frey N., Shaw P.A., Aplenc R., Barrett D.M., Bunin N.J., Chew A., Gonzalez V.E., Zheng Z., Lacey S.F., Mahnke Y.D., Melenhorst J.J., Rheingold S.R., Shen A., Teachey D.T., Levine B.L., June C.H., Porter D.L., Grupp S.A.* Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia // *N. Engl. J. Med.* – 2014. – V. 371, No 16. – P. 1507–1517. – doi: 10.1056/NEJMoa1407222.
9. *Porter D.L., Hwang W.T., Frey N.V., Lacey S.F., Shaw P.A., Loren A.W., Bagg A., Marcucci K.T., Shen A., Gonzalez V., Ambrose D., Grupp S.A., Chew A., Zheng Z., Milone M.C., Levine B.L., Melenhorst J.J., June C.H.* Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia // *Sci. Transl. Med.* – 2015. – V. 7, No 303. – Art. 303ra139. – doi: 10.1126/scitranslmed.aac5415.
10. *Turtle C.J., Hanafi L.A., Berger C., Gooley T.A., Cherian S., Hudecek M., Sommermeyer D., Melville K., Pender B., Budiarto T.M., Robinson E., Stevens N.N., Chaney C., Soma L., Chen X., Yeung C., Wood B., Li D., Cao J., Heimfeld S., Jensen M.C., Riddell S.R., Maloney D.G.* CD19 CAR-T cells of defined CD4⁺:CD8⁺ composition in adult B cell ALL patients // *J. Clin. Invest.* 2016. – V. 126, No 6. – P. 2123–2138. – doi: 10.1172/JCI85309.

11. Turtle C.J., Hanafi L.A., Berger C., Hudecek M., Pender B., Robinson E., Hawkins R., Chaney C., Cherian S., Chen X., Soma L., Wood B., Li D., Heimfeld S., Riddell S.R., Maloney D.G. Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8⁺ and CD4⁺ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells // *Sci. Transl. Med.* – 2016. – V. 8, No 355. – Art. 355ra116. – doi: 10.1126/scitranslmed.aaf8621.
12. Turtle C.J., Riddell S.R., Maloney D.G. CD19-targeted chimeric antigen receptor-modified T-cell immunotherapy for B-cell malignancies // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2016. – V. 100, No 3. – P. 252–258. – doi: 10.1002/cpt.392.
13. Lee D.W., Kochenderfer J.N., Stetler-Stevenson M., Cui Y.K., Delbrook C., Feldman S.A., Fry T.J., Orentas R., Sabatino M., Shah N.N., Steinberg S.M., Stroncek D., Tschernia N., Yuan C., Zhang H., Zhang L., Rosenberg S.A., Wayne A.S., Mackall C.L. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: A phase 1 dose-escalation trial // *Lancet.* – 2015. – V. 385, No 9967. – P. 517–528. – doi: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3.
14. Grupp S.A., Maude S.L., Shaw P.A., Aplenc R., Barrett D.M., Callahan C., Lacey S.F., Levine B.L., Melenhorst J.J., Motley L., Rheingold S.R., Teachey D.T., Wood P.A., Porter D., June C.H. Durable remissions in children with relapsed/refractory ALL treated with T cells engineered with a CD19-targeted chimeric antigen receptor (CTL019) // *Blood.* – 2015. – V. 126, No 23. – P. 681. – doi: 10.1182/blood.V126.23.681.681.
15. Buechner J., Grupp S.A., Maude S.L., Boyer M., Bittencourt H., Laetsch T.W., Bader P., Verneris M.R., Stefanski H., Myers G.D., Qayed M., Pulsipher M.A., De Moerloose B., Hiramatsu H., Schlis K., Davis K., Martin P.L., Nemecek E., Peters Ch., Wood P., Taran T., Mueller K.Th., Zhang Y., Rives S. Global registration trial of efficacy and safety of CTL019 in pediatric and young adult patients with relapsed/refractory (R/R) acute lymphoblastic leukemia (ALL): Update to the interim analysis // *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.* – 2017. – V. 17, Suppl. 2 – P. S263–S264. – doi: 10.1016/j.clml.2017.07.030.
16. Gardner R.A., Finney O., Annesley C., Brakke H., Summers C., Leger K., Bleakley M., Brown C., Mgebroff S., Kelly-Spratt K.S., Hoglund V., Lindgren C., Oron A.P., Li D., Riddell S.R., Park J.R., Jensen M.C. Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults // *Blood.* – 2017. – V. 129, No 25. – P. 3322–3331. – doi: 10.1182/blood-2017-02-769208.
17. Berdeja J.G., Lin Y., Raje N., Munshi N., Siegel D., Liedtke M., Jaqannath S., Maus M.V., Turka A., Lam L.P., Hege K., Morgan R.A., Quigley M.T., Kochenderfer J.N. Durable clinical responses in heavily pretreated patients with relapsed/refractory multiple myeloma: Updated results from a multicenter study of bb2121 anti-BCMA CAR T cell therapy // *Blood.* – 2017. – V. 130, Suppl. 1. – P. 740. – doi: 10.1182/blood.V130.Suppl_1.740.740.
18. Zhao J., Lin Q., Song Y., Liu D. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells // *J. Hematol. Oncol.* – 2018. – V. 11. – Art. 132, P. 1–9. – doi: 10.1186/s13045-018-0677-2.
19. Mirzaei H.R., Rodriguez A., Shepphird J., Brown C.E., Badie B. Chimeric antigen receptors T cell therapy in solid tumor: Challenges and clinical applications // *Front. Immunol.* – 2017. – V. 8. – Art. 1850, P. 1–13. – doi: 10.3389/fimmu.2017.01850.
20. Yu W.-L., Hua Z.C. Chimeric antigen receptor T-cell (CAR T) therapy for hematologic and solid malignancies: efficacy and safety – A systematic review with meta-analysis // *Cancers (Basel).* – 2019. – V. 11, No 1. – Art. 47, P. 1–27. – doi: 10.3390/cancers11010047.
21. Thanindrataran P., Dean D.C., Nelson S.D., Hornicek F.J., Duan Z. Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell immunotherapy for sarcomas: From mechanisms to potential clinical applications // *Cancer Treat. Rev.* – 2020. – V. 82. – Art. 101934, P. 1–10. – doi: 10.1016/j.ctrv.2019.101934.

22. Петухов А.В., Маркова В.А., Моторин Д.В., Титов А.К., Белозерова Н.С., Гершювич П.М., Карабельский А.В., Иванов Р.А., Зайкова Е.К., Смирнов Е.Ю., Бутылин П.А., Зарицкий А.Ю. Получение CAR T-лимфоцитов, специфичных к CD19, и оценка их функциональной активности *in vitro* // Клиническая онкогематология. – 2018. – Т. 11, № 1. – P. 1–9. – doi: 10.21320/2500-2139-2018-11-1-1-9.
23. Pan J., Yang J.F., Deng B.P., Zhao X.J., Zhang X., Lin Y.H., Wu Y.N., Deng Z.L., Zhang Y.L., Liu S.H., Wu T., Lu P.H., Lu D.P., Chang A.H., Tong C.R. High efficacy and safety of low-dose CD19-directed CAR-T cell therapy in 51 refractory or relapsed B acute lymphoblastic leukemia patients // *Leukemia*. – 2017. – V. 31, No 12. – P. 2587–2593. – doi: 10.1038/leu.2017.145.
24. Blaeschke F., Stenger D., Kaeuferle T., Willier S., Lotfi R., Kaiser A.D., Assenmacher M., Döring M., Feucht J., Feuchtinger T. Induction of a central memory and stem cell memory phenotype in functionally active CD4⁺ and CD8⁺ CAR T cells produced in an automated good manufacturing practice system for the treatment of CD19⁺ acute lymphoblastic leukemia // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2018. – V. 67, No 7. – P. 1053–1066. – doi: 10.1007/s00262-018-2155-7.
25. Fan D., Li W., Yang Y., Zhang X., Zhang Q., Yan Y., Yang M., Wang J., Xiong D. Redirection of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes via an anti-CD3 × anti-CD19 bi-specific antibody combined with cytosine arabinoside and the efficient lysis of patient-derived B-ALL cells // *J. Hematol. Oncol.* – 2015. – V. 8. – Art. 108, P. 1–12. – doi: 10.1186/s13045-015-0205-6.
26. Kenderian S.S., Ruella M., Gill S., Kalos M. Chimeric antigen receptor T-cell therapy to target hematologic malignancies // *Cancer Res.* – 2014. – V. 74, No 22. – P. 6383–6389. – doi: 10.1158/0008-5472.
27. Zhang W., Jordan K.R., Schulte B., Purev E. Characterization of clinical grade CD19 chimeric antigen receptor T cells produced using automated CliniMACS Prodigy system // *Drug Des. Dev. Ther.* – 2018. – V. 12. – P. 3343–3356. – doi: 10.2147/DDDT.S175113.
28. Hay K.A., Hanafi L.A., Li D., Gust J., Liles W.C., Wurfel M.M., Lopez J.A., Chen J., Chung D., Harju-Baker S., Cherian S., Chen X., Riddell S.R., Maloney D.G., Turtle C.J. Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy // *Blood*. – 2017. – V. 130, No 21. – P. 2295–2306. – doi: 10.1182/blood-2017-06-793141.

Поступила в редакцию
04.12.2021

Валиуллина Айгуль Хабибулловна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник НИЛ «Биомедицинские технологии»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: aiqull1692@mail.ru

Змиевская Екатерина Анатольевна, младший научный сотрудник, НИЛ «Биомедицинские технологии»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: ekazmievskaia@gmail.com

Рахматуллина Айгуль Римхатовна, младший научный сотрудник НИЛ «Трансляционная онкология»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: rahmatullina_2011@mail.ru

Журавлева Маргарита Николаевна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник НИЛ OpenLab «Генные и клеточные технологии»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *k.i.t.t.1807@gmail.com*

Гаранина Екатерина Евгеньевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, НИЛ OpenLab «Генные и клеточные технологии»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *kathryn.cherenkova@gmail.com*

Мифтахова Регина Рифкатовна, PhD, старший научный сотрудник НИЛ «Трансляционная онкология»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *regina.miftakhova@gmail.com*

Петухов Алексей Вячеславович, научный сотрудник отдела фундаментальной онкологии группы генной инженерии и клеточной терапии

ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России
ул. Аккуратова, д. 2, г. Санкт-Петербург, 197341, Россия
E-mail: *alexseysakhalin@gmail.com*

Ризванов Альберт Анатольевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, НИЛ OpenLab «Генные и клеточные технологии»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *rizvanov@gmail.com*

Булатов Эмиль Рафаэлевич, PhD, ведущий научный сотрудник, НИЛ «Биомедицинские технологии»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *bulatovemil@gmail.com*

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2022.2.212-230

Evaluation of CAR-T Cell Cytotoxicity against a Prostate Carcinoma Model

A.Kh. Valiullina^{a*}, *E.A. Zmievskaya*^{a**}, *A.R. Rakhmatullina*^{a***}, *M.N. Zhuravleva*^{a****},
E.E. Garanina^{a*****}, *R.R. Miftakhova*^{a*****}, *A.V. Petukhov*^{b*****}, *A.A. Rizvanov*^{a*****},
E.R. Bulatov^{a*****}

^a*Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

^b*Almazov National Medical Research Centre, Ministry of Health of the Russian Federation,
St. Petersburg, 197341 Russia*

E-mail: ^{*}*aigul1692@mail.ru*, ^{**}*ekazmievskaya@gmail.com*, ^{***}*rahmatullina_2011@mail.ru*,
^{****}*k.i.t.1807@gmail.com*, ^{*****}*kathryn.cherenkova@gmail.com*, ^{*****}*regina.miftakhova@gmail.com*,
^{*****}*alexeyakhalin@gmail.com*, ^{*****}*rizvanov@gmail.com*, ^{*****}*bulatovemil@gmail.com*

Received December 4, 2021

Abstract

In recent years, a new promising application of adoptive cell therapy (ACT) has been enabled by the development of technologies and the successful clinical use of T cells with a chimeric antigen receptor (CAR-T) for treating patients with malignant B-cell neoplasms. In this study, we obtained CAR-T cells with the second-generation chimeric antigen receptor FMC63-28Z-CAR. The effectiveness of the obtained CAR-T cells against the monolayer of the modified PC-3M prostate carcinoma cell line (Kat⁺CD19⁺) was evaluated. A correlation was demonstrated between an increased secretion of the pro-inflammatory cytokines IFN γ , TNF α , IL6 and a decreased confluence of the tumor cells monolayer. At the same time, a pronounced antitumor effect of CAR-T cells was observed starting from day 5 of cocultivation. Thus, the proposed approach can potentially be applied for a preliminary evaluation of the effectiveness of biomedical CAR-T cell products in the treatment of solid tumors.

Keywords: CAR-T cells, chimeric antigen receptor, solid tumor, cell model, prostate carcinoma, PC-3M

Acknowledgments. This study was funded by the Russian Science Foundation (project no. 19-74-20026) and supported by the Kazan Federal University Strategic Academic Leadership Program (PRIORITY-2030). Part of the consumables (laboratory plasticware, interleukin-2) were purchased through a joint grant from the Foundation for Cancer Research Support (RakFond) and the SciStoreLab LLC.

Figure Captions

Fig. 1. Evaluation of the transduction efficiency of T lymphocytes by lentiviral particles. *a* – dot plot: the population of T cells on the forward and side scatter plot, the population of T cells is highlighted; *b* – dot plot: the population of GFP-positive T lymphocytes (CAR-T cells); *c* – dot plot: assessment of the CAR-T cells content by the signal level of biotinylated protein L conjugated with streptavidin-Pacific Blue; *d* – dot plot: the subpopulations of CD4⁺ and CD8⁺ in the total population of CAR-T cells. The upper left quadrant represents the population of CD4⁺ CAR-T cells, the lower right quadrant represents the population of CD8⁺ CAR-T cells.

Fig. 2. Evaluation of the transduction efficiency of the PC-3M cell line with lentiviral particles encoding for the red fluorescent protein Katushka2S and CD19 antigen. *a* – dot plot: the unmodified control line PC-3M; *b* – dot plot: the level of transduction of PC-3M cells by lentiviral particles encoding for the red fluorescent protein Katushka2S; *c* – dot plot: the unmodified control line PC-3M; *d* – dot plot: the level of transduction of PC-3M(Kat⁺) cells by lentiviral particles encoding for CD19 antigen.

Fig. 3. Evaluation of the CAR-T cells effectiveness against the tumor cell line PC-3M(Kat⁺CD19⁺) in the dynamic evaluation of the changes in confluence from days 1 to 7 of co-cultivation. The results are presented as the mean value, the error bars indicate the standard deviation ($n = 3$, $p < 0.05$).

Fig. 4. Micrographs of the monolayer of the tumor cell lines PC-3M(Kat⁺) and PC-3M(Kat⁺CD19⁺) co-cultivated with CAR-T cells. Light microscopy, fluorescence microscopy, representative micrographs ($n = 6$) are shown, scale bar is 100 μm . CAR-T cells – green fluorescence. Tumor cells PC-3M(Kat⁺) and PC-3M(Kat⁺CD19⁺) – red fluorescence.

Fig. 5. Heat map of the levels of expression of IFN γ , IL6, and TNF α in the culture medium during the co-cultivation of CAR-T cells with the tumor cell lines PC-3M(Kat⁺) and PC-3M(Kat⁺CD19⁺) at different time points.

References

1. Eshhar Z. The T-body approach: Redirecting T cells with antibody specificity. In: Chernajovsky Y., Nissim A. (Eds.) *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin, Heidelberg, Springer, 2008, vol. 181, pp. 329–342. doi: 10.1007/978-3-540-73259-4_14.
2. Curran K.J., Pegram H.J., Brentjens R.J. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: Current understanding and future directions. *J. Gene Med.*, 2012, vol. 14, no. 6, pp. 405–415. doi: 10.1002/jgm.2604.
3. Dai H., Wang Y., Lu X., Han W. Chimeric antigen receptors modified T-cells for cancer therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2016, vol. 108, no. 7, art. djv439, pp. 1–14. doi: 10.1093/jnci/djv439.
4. Eshhar Z., Waks T., Gross G., Schindler D.G. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1993, vol. 90, no. 2, pp. 720–724. doi: 10.1073/pnas.90.2.720.
5. Scheuermann R.H., Racila E. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy. *Leuk. Lymphoma*, 1995, vol. 18, nos. 5–6, pp. 85–97. doi: 10.3109/10428199509059636.
6. Davila M.L., Riviere I., Wang X., Bartido S., Park J., Curran K., Chung S.S., Stefanski J., Borquez-Ojeda O., Olszewska M., Qu J., Wasielewska T., He Q., Fink M., Shinglot H., Youssif M., Satter M., Wang Y., Hosey J., Quintanilla H., Halton E., Bernal Y., Bouhassira D.C., Arcila M.E., Gonen M., Roboz G.J., Maslak P., Douer D., Frattini M.G., Giralto S., Sadelain M., Brentjens R. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Transl. Med.*, 2014, vol. 6, no. 224, art. 224ra25, pp. 1–23. doi: 10.1126/scitranslmed.3008226.
7. Kochenderfer J.N., Dudley M.E., Kassim S.H., Somerville R.P., Carpenter R.O., Stetler-Stevenson M., Yang J.C., Phan G.Q., Hughes M.S., Sherry R.M., Raffeld M., Feldman S., Lu L., Li Y.F., Ngo L.T., Goy A., Feldman T., Spaner D.E., Wang M.L., Chen C.C., Kranick S.M., Nath A., Nathan D.A., Morton K.E., Toomey M.A., Rosenberg S.A. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J. Clin. Oncol.*, 2015, vol. 33, no. 6, pp. 540–549. doi: 10.1200/JCO.2014.56.2025.
8. Maude S.L., Frey N., Shaw P.A., Aplenc R., Barrett D.M., Bunin N.J., Chew A., Gonzalez V.E., Zheng Z., Lacey S.F., Mahnke Y.D., Melenhorst J.J., Rheingold S.R., Shen A., Teachey D.T., Levine B.L., June C.H., Porter D.L., Grupp S.A. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2014, vol. 371, no. 16, pp. 1507–1517. doi: 10.1056/NEJMoa1407222.
9. Porter D.L., Hwang W.T., Frey N.V., Lacey S.F., Shaw P.A., Loren A.W., Bagg A., Marcucci K.T., Shen A., Gonzalez V., Ambrose D., Grupp S.A., Chew A., Zheng Z., Milone M.C., Levine B.L., Melenhorst J.J., June C.H. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci. Transl. Med.*, 2015, vol. 7, no. 303, art. 303ra139. doi: 10.1126/scitranslmed.aac5415.
10. Turtle C.J., Hanafi L.A., Berger C., Gooley T.A., Cherian S., Hudecek M., Sommermeyer D., Melville K., Pender B., Budiarto T.M., Robinson E., Stevens N.N., Chaney C., Soma L., Chen X., Yeung C., Wood B., Li D., Cao J., Heimfeld S., Jensen M.C., Riddell S.R., Maloney D.G. CD19 CAR-T cells of defined CD4⁺:CD8⁺ composition in adult B cell ALL patients. *J. Clin. Invest.*, 2016, vol. 126, no. 6, pp. 2123–2138. doi: 10.1172/JCI85309.

11. Turtle C.J., Hanafi L.A., Berger C., Hudecek M., Pender B., Robinson E., Hawkins R., Chaney C., Cheria S., Chen X., Soma L., Wood B., Li D., Heimfeld S., Riddell S.R., Maloney D.G. Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8⁺ and CD4⁺ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Sci. Transl. Med.*, 2016, vol. 8, no. 355, art. 355ra116. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf8621.
12. Turtle C.J., Riddell S.R., Maloney D.G. CD19-targeted chimeric antigen receptor-modified T-cell immunotherapy for B-cell malignancies. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2016, vol. 100, no. 3, pp. 252–258. doi: 10.1002/cpt.392.
13. Lee D.W., Kochenderfer J.N., Stetler-Stevenson M., Cui Y.K., Delbrook C., Feldman S.A., Fry T.J., Orentas R., Sabatino M., Shah N.N., Steinberg S.M., Stronck D., Tschernia N., Yuan C., Zhang H., Zhang L., Rosenberg S.A., Wayne A.S., Mackall C.L. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: A phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*, 2015, vol. 385, no. 9967, pp. 517–528. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3.
14. Grupp S.A., Maude S.L., Shaw P.A., Aplenc R., Barrett D.M., Callahan C., Lacey S.F., Levine B.L., Melenhorst J.J., Motley L., Rheingold S.R., Teachey D.T., Wood P.A., Porter D., June C.H. Durable remissions in children with relapsed/refractory ALL treated with T cells engineered with a CD19-targeted chimeric antigen receptor (CTL019). *Blood*, 2015, vol. 126, no. 23, p. 681. doi: 10.1182/blood.V126.23.681.681.
15. Buechner J., Grupp S.A., Maude S.L., Boyer M., Bittencourt H., Laetsch T.W., Bader P., Verneris M.R., Stefanski H., Myers G.D., Qayed M., Pulsipher M.A., De Moerloose B., Hiramatsu H., Schlis K., Davis K., Martin P.L., Nemecek E., Peters Ch., Wood P., Taran T., Mueller K.Th., Zhang Y., Rives S. Global registration trial of efficacy and safety of CTL019 in pediatric and young adult patients with relapsed/refractory (R/R) acute lymphoblastic leukemia (ALL): Update to the interim analysis. *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.*, 2017, vol. 17, suppl. 2, pp. S263–S264. doi: 10.1016/j.clml.2017.07.030.
16. Gardner R.A., Finney O., Annesley C., Brakke H., Summers C., Leger K., Bleakley M., Brown C., Mgebroff S., Kelly-Spratt K.S., Hoglund V., Lindgren C., Oron A.P., Li D., Riddell S.R., Park J.R., Jensen M.C. Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. *Blood*, 2017, vol. 129, no. 25, pp. 3322–3331. doi: 10.1182/blood-2017-02-769208.
17. Berdeja J.G., Lin Y., Raje N., Munshi N., Siegel D., Liedtke M., Jaqannath S., Maus M.V., Turka A., Lam L.P., Hege K., Morgan R.A., Quigley M.T., Kochenderfer J.N. Durable clinical responses in heavily pretreated patients with relapsed/refractory multiple myeloma: Updated results from a multicenter study of bb2121 anti-BCMA CAR T cell therapy. *Blood*, 2017, vol. 130, suppl. 1, p. 740. doi: 10.1182/blood.V130.Suppl_1.740.740.
18. Zhao J., Lin Q., Song Y., Liu D. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells. *J. Hematol. Oncol.*, 2018, vol. 11, art. 132, pp. 1–9. doi: 10.1186/s13045-018-0677-2.
19. Mirzaei H.R., Rodriguez A., Shepphird J., Brown C.E., Badie B. Chimeric antigen receptors T cell therapy in solid tumor: Challenges and clinical applications. *Front. Immunol.*, 2017, vol. 8, art. 1850, pp. 1–13. doi: 10.3389/fimmu.2017.01850.
20. Yu W.-L., Hua Z.C. Chimeric antigen receptor T-cell (CAR T) therapy for hematologic and solid malignancies: Efficacy and safety – a systematic review with meta-analysis. *Cancers (Basel)*, 2019, vol. 11, no. 1, art. 47, pp. 1–27. doi: 10.3390/cancers11010047.
21. Thanindrataran P., Dean D.C., Nelson S.D., Hornicek F.J., Duan Z. Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell immunotherapy for sarcomas: From mechanisms to potential clinical applications. *Cancer Treat. Rev.*, 2020, vol. 82, art. 101934, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.ctrv.2019.101934.
22. Petukhov A.V., Markova V.A., Motorin D.V., Titov A.K., Belozeroва N.S., Gershovich P.M., Karabel'skii A.V., Ivanov R.A., Zaikova E.K., Smirnov E.Yu., Butylin P.A., Zaritskii A.Yu. Manufacturing CD19 specific CAR T cells and evaluating their functional activity in vitro. *Klin. Onkogematol.*, 2018, vol. 11, no. 1, pp. 1–9. doi: 10.21320/2500-2139-2018-11-1-1-9. (In Russian)
23. Pan. J., Yang J.F., Deng B.P., Zhao X.J., Zhang X., Lin Y.H., Wu Y.N., Deng Z.L., Zhang Y.L., Liu S.H., Wu T., Lu P.H., Lu D.P., Chang A.H., Tong C.R. High efficacy and safety of low-dose CD19-directed CAR-T cell therapy in 51 refractory or relapsed B acute lymphoblastic leukemia patients. *Leukemia*, 2017, vol. 31, no. 12, pp. 2587–2593. doi: 10.1038/leu.2017.145.

24. Blaeschke F., Stenger D., Kaeuferle T., Willier S., Lotfi R., Kaiser A.D., Assenmacher M., Döring M., Feucht J., Feuchtinger T. Induction of a central memory and stem cell memory phenotype in functionally active CD4⁺ and CD8⁺ CAR T cells produced in an automated good manufacturing practice system for the treatment of CD19⁺ acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2018, vol. 67, no. 7, pp. 1053–1066. doi: 10.1007/s00262-018-2155-7.
25. Fan D., Li W., Yang Y., Zhang X., Zhang Q., Yan Y., Yang M., Wang J., Xiong D. Redirection of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes via an anti-CD3 × anti-CD19 bi-specific antibody combined with cytosine arabinoside and the efficient lysis of patient-derived B-ALL cells. *J. Hematol. Oncol.*, 2015, vol. 8, art. 108, pp. 1–12. doi: 10.1186/s13045-015-0205-6.
26. Kenderian S.S., Ruella M., Gill S., Kalos M. Chimeric antigen receptor T-cell therapy to target hematologic malignancies. *Cancer Res.*, 2014, vol. 74, no. 22, pp. 6383–6389. doi: 10.1158/0008-5472.
27. Zhang W., Jordan K.R., Schulte B., Purev E. Characterization of clinical grade CD19 chimeric antigen receptor T cells produced using automated CliniMACS Prodigy system. *Drug Des., Dev. Ther.*, 2018, vol. 12, pp. 3343–3356. doi: 10.2147/DDDT.S175113.
28. Hay K.A., Hanafi L.A., Li D., Gust J., Liles W.C., Wurfel M.M., Lopez J.A., Chen J., Chung D., Harju-Baker S., Cherian S., Chen X., Riddell S.R., Maloney D.G., Turtle C.J. Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor–modified T-cell therapy. *Blood*, 2017, vol. 130, no. 21, pp. 2295–2306. doi: 10.1182/blood-2017-06-793141.

Для цитирования: Валиуллина А.Х., Змиевская Е.А., Рахматуллина А.Р., Журавлева М.Н., Гаранина Е.Е., Мифтахова Р.Р., Петухов А.В., Ризванов А.А., Булатов Э.Р. Оценка цитотоксичности CAR-T-клеток против модели карциномы предстательной железы // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2022. – Т. 164, кн. 2. – С. 212–230. – doi: 10.26907/2542-064X.2022.2.212-230.

For citation: Valiullina A.Kh., Zmievskaia E.A., Rakhmatullina A.R., Zhuravleva M.N., Garanina E.E., Miftakhova R.R., Petukhov A.V., Rizvanov A.A., Bulatov E.R. Evaluation of CAR-T cell cytotoxicity against a prostate carcinoma model. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2022, vol. 164, no. 2, pp. 212–230. doi: 10.26907/2542-064X.2022.2.212-230. (In Russian)