

Anti-CD19 CAR-T: опыт получения и первичное тестирование продукта

¹Петухов А.В., ²Маркова В.А., ¹Титов А.К., ²Белозерова Н.С., ²Гершович П.М., ²Карабельский А.В., ²Иванов Р.А.,
¹Моторин Д.В., ¹Зайкова Е.К., ²Смирнов Е.И., ¹Бутылин П.А., ¹Зарицкий А.Ю.

¹ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия; ² Биотехнологическая компания Биокад, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в лечении некоторых видов гемобластозов были достигнуты существенные успехи. Одним из наиболее перспективных направлений в лечении В-линейных онкогематологических заболеваний является CAR-T-терапия. CAR-T представляет собой Т-лимфоцит, в геном которого внедрен ген CAR (химерного антигенного рецептора). Внеклеточный домен данного рецептора обеспечивает распознавание мишени (например, CD19), а внутриклеточный – активирует CAR-T, что ведет к уничтожению клетки-мишени за счет механизмов Т-клеточной цитотоксичности.

В данном исследовании нами были получены потенциально клинически применимые CAR-T и исследована их цитотоксичность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивируемые Т-лимфоциты человека (Т-ЛФ) были получены из мононуклеарной фракции периферической крови здорового донора путем центрифугирования в градиенте плотности с использованием Ficoll-Paque плотностью 1.078 г/мл (GE Healthcare, США). Для селекции и активации Т-ЛФ были применены частицы DynabeadsHumanT-activatorCD3/CD28 (Invitrogen, США). Клетки культивировались на среде RPMI (ПанЭко, Россия), с добавлением 10% фетальной бычей сыворотки (Hyclone, США) 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 300 ЕД/мл рекомбинантного человеческого IL-2 (Биотех, Россия).

Через 48 часов после активации, культура Т-лимфоцитов подвергалась трансдукции лентивирусным препаратом, содержащим гены CAR, специфичного к CD19, пептида RIAD для усиления активационного сигнала и репортерного белка GFP для оценки эффективности трансдукции. Впоследствии клетки продолжали инкубировать на среде RPMI в течение 72 часов. Эффективность трансдукции Т-лимфоцитов оценивалась по уровню детекции сигнала репортерного белка GFP методом проточной цитометрии. Для анализа жизнеспособности клеток применялся пропидий йодид (ThermoFisher, США).

Также была создана инженерная клеточная линия K562-CD19+, сверхэкспрессирующая CD19. В дальнейшем клетки этой линии были задействованы в качестве мишеней для проверки функциональной активности CAR-T-лимфоцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Жизнеспособность Т-лимфоцитов на 3 день после трансдукции лентивирусным препаратом достигала 91,87% (рис. 1). Экспрессия репортерного белка GFP в жизнеспособных Т-лимфоцитах составляла 50,87%. При оценке пролиферативной активности Т-ЛФ в случае культивирования в среде, содержащей IL-2 без добавления специфического активатора (rCD19), количество CAR-T через 120 часов снижается в 1,5 раза

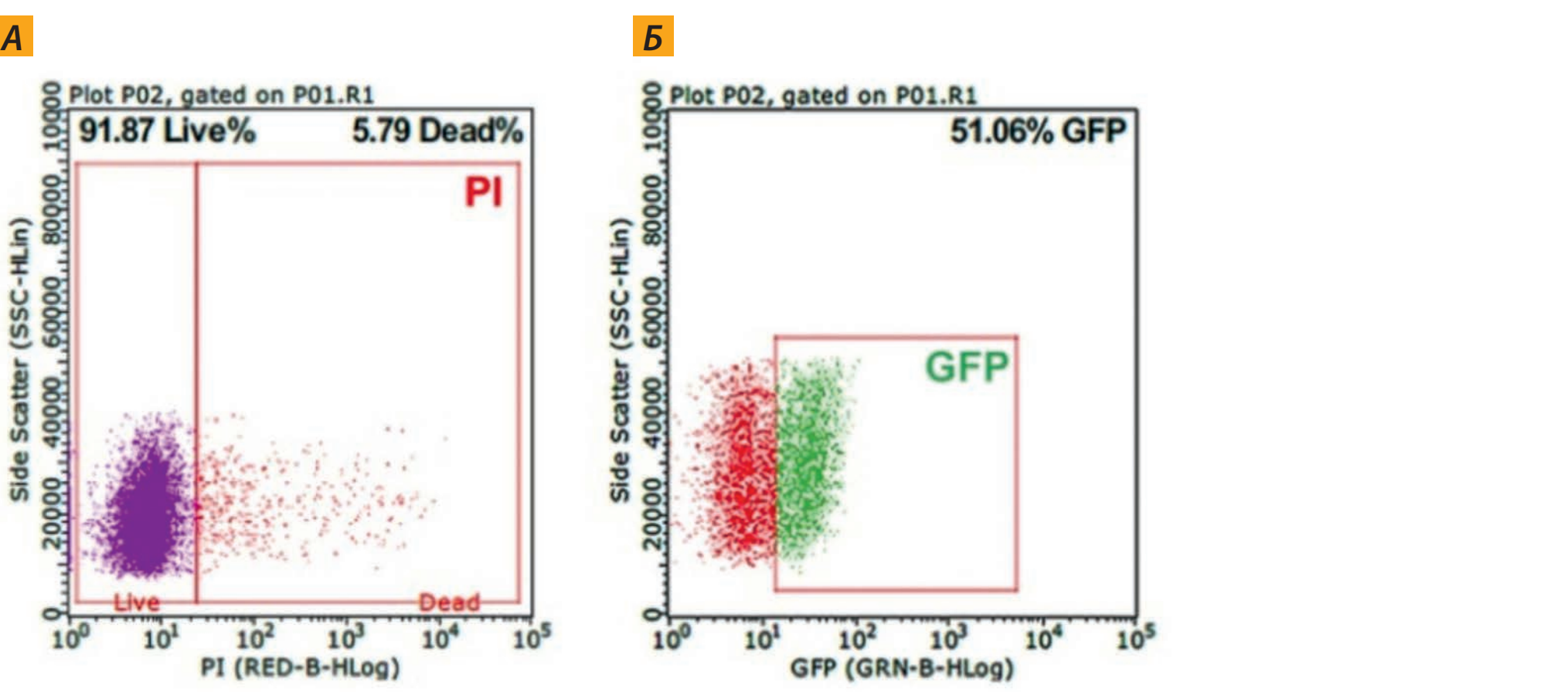


Рис. 1. Оценка жизнеспособности и эффективности трансдукции Т-ЛФ через 72 ч после трансдукции лентивирусным препаратом anti-CD19-CAR-RIAD-GFP. (А) Гистограмма распределения: жизнеспособность Т-ЛФ (окраска PI); (Б) Гистограмма распределения: уровень экспрессии GFP в Т-ЛФ.

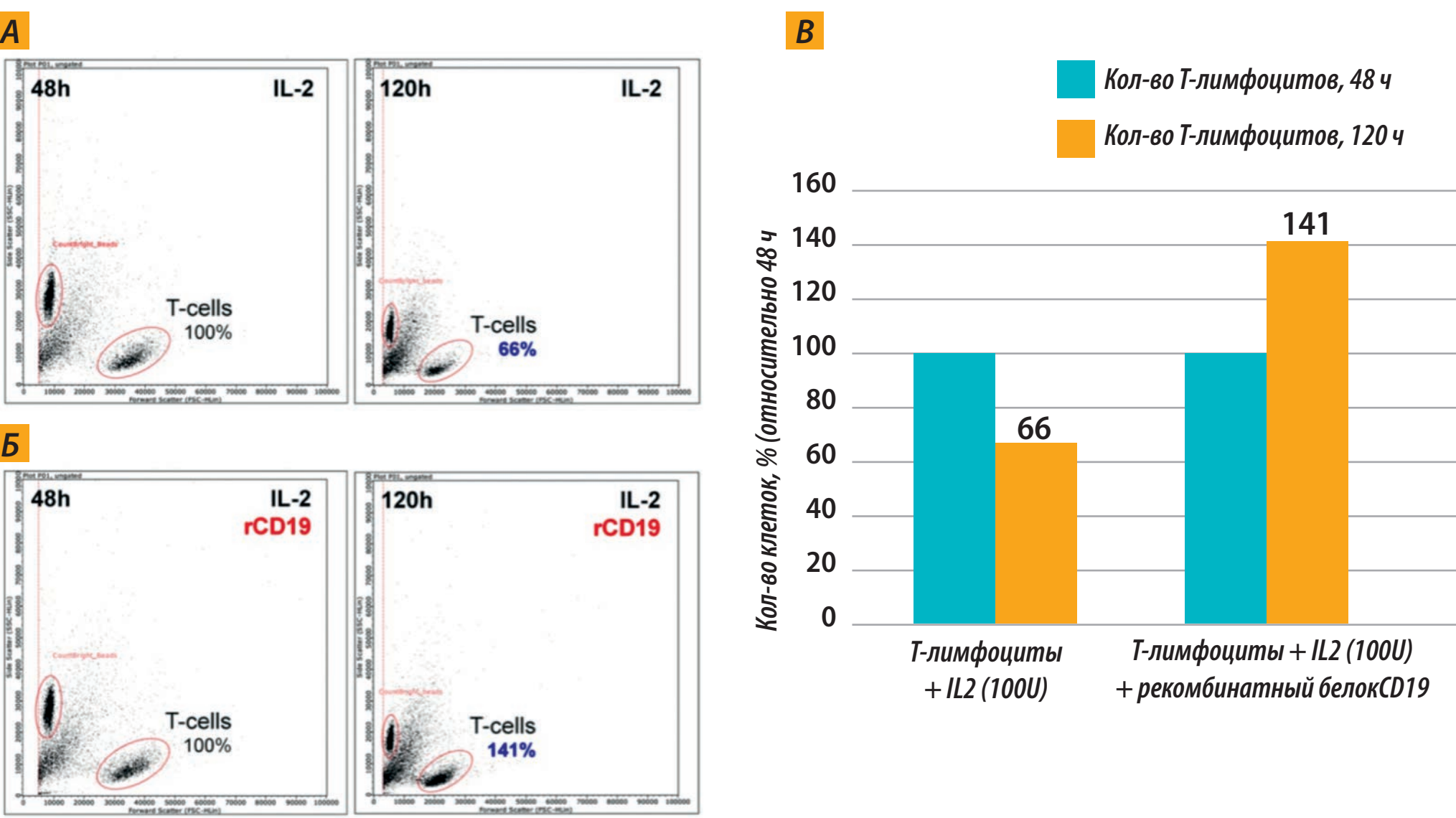


Рис. 2. Оценка пролиферативной активности anti-CD19- CAR-RIAD-GFP Т-лимфоцитов человека в присутствии человеческого рекомбинантного CD19. (А) Гистограмма распределения: Т-лимфоциты, культивируемые в присутствии IL-2 (100U); (Б) Гистограмма распределения: Т-лимфоциты, культивируемые в присутствии IL-2 (100U) и CD19 (2 мкг/мл); (В) Динамика изменения количества Т-лимфоцитов после 120 ч культивирования

относительно их числа через 48 ч культивирования. В то же время, в присутствии rCD19 (2 мкг/мл) количество CAR-T через 120 ч увеличивается в 1,4 раза относительно 48 ч (рис. 2).

Для оценки цитотоксической активности Т-ЛФ, данные клетки культивировались совместно с клетками мишенями линии K562-CD19+/- . После 48 часов культивирования CAR-T с клетками K562-CD19- количество Т-ЛФ снижалось до 36,2%. В случае культивирования CAR-T с клетками K562-CD19+, экспрессирующими таргетный антиген, процент CAR-T увеличивается до 57% и 84,5% после 48 и 120 часов экспозиции соответственно (рис. 3). Жизнеспособность клеток-мишеней через 120 ч культивирования заметно снижалась в экспериментальной группе, по сравнению с контрольной (3,5% против 36,74%). Жизнеспособность и GFP-позитивность CAR-T в экспериментальной группе составила 78,98% и 45,79% соответственно.

Также оценивалась концентрация цитокинов (IL2, IL4, IL6, IL10, TNF и IFN γ) в культуральной среде при со-культивировании CAR-T с CD19+/- клетками-мишенями линии K562. При со-культивировании с клетками K562-CD19+ по сравнению с контрольной группой значительно увеличивалась концентрация следующих цитокинов: IL-2, TNF, IFN γ .

В то же время концентрация IL-6, IL-10, IL-4 изменялась незначительно по сравнению с контрольной группой (рис. 4).

ВЫВОДЫ

1. Лентивирусный вектор эффективно трансдуцировал Т-лимфоциты и практически не влиял на их жизнеспособность при последующем культивировании.
2. Общее количество CAR-T в присутствии rCD19 возрастало по сравнению с контрольной группой.
3. При со-культивировании CAR-T с K562-CD19+ наблюдалась активная элиминация и снижение жизнеспособности CD19 позитивных клеток-мишеней при значительном и устойчивом превалировании CAR-T в смешанной популяции клеток.
4. Различия в концентрации IL-6 между контрольной и экспериментальной группой заметно меньше различий в концентрации других цитокинов между этими группами (IFN γ , IL-2, TNF). Учитывая крайне высокие уровни IL-6, наблюдаемые у пациентов с синдромом цитокинового шторма на фоне терапии CAR-T, а также опубликованные данные, вероятно, данные клетки, не являются основным источником IL-6.

Получение потенциально клинически применимых CAR-T является первым шагом к развитию технологии адоптивной иммунотерапии в Российской Федерации. В настоящее время нами также реализуется стратегия, направленная на снижение токсичности CAR-терапии и получение аллогенного off-the-shelf препарата.

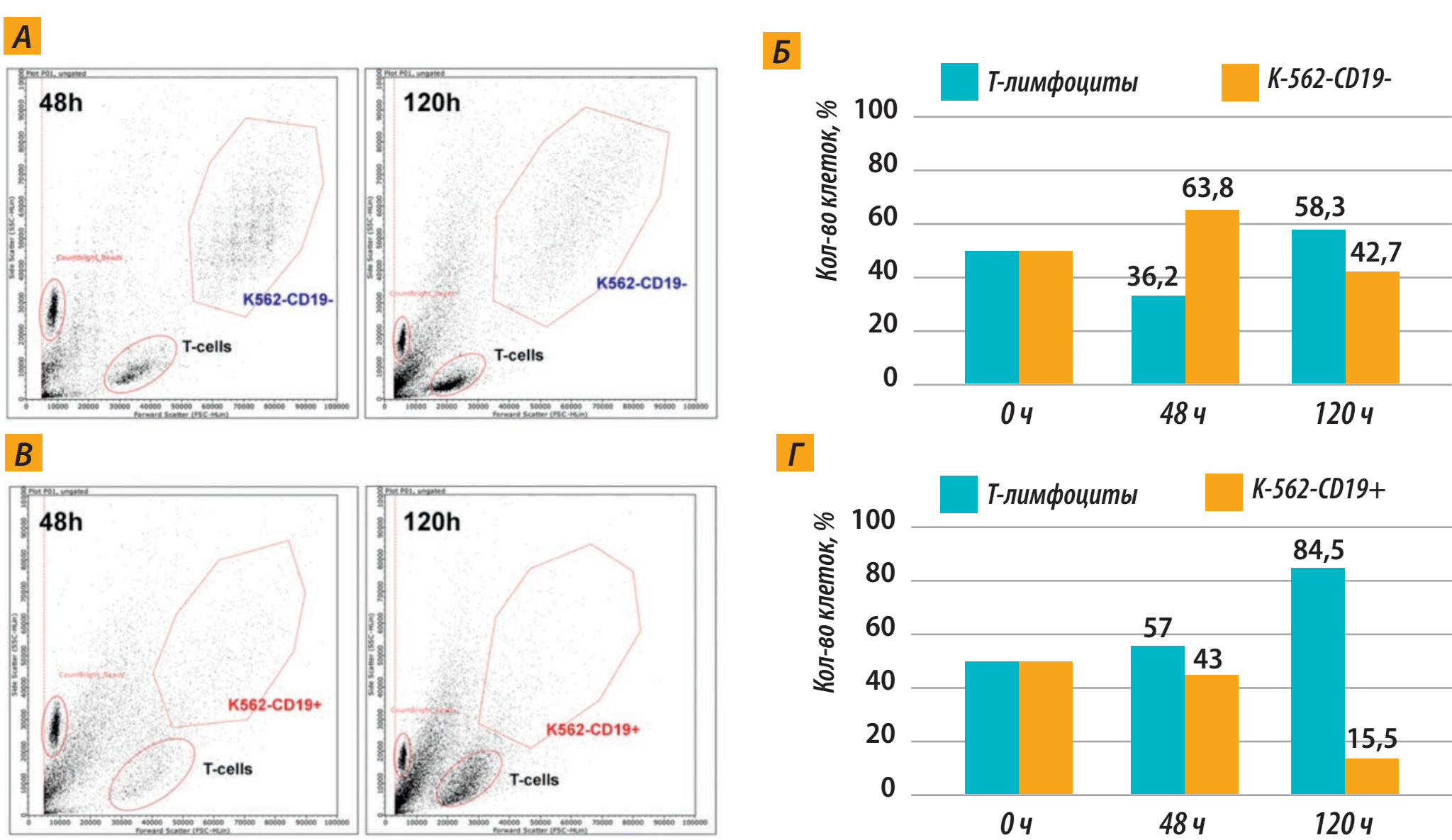


Рис. 3. Оценка цитотоксической активности Т-лимфоцитов человека после трансдукции лентивирусным препаратом anti-CD19-scramble-RIAD-GFP при со-культивировании с клетками мишеням K562-CD19- и K562-CD19+. (А) Гистограмма распределения: Т-лимфоциты и клетки K562-CD19- (1:1), 48 ч и 120 ч после начала со-культивирования; (Б) Динамика изменения процентного соотношения Т-лимфоцитов и клеток K562-CD19- (1:1) при со-культивировании, 48 ч и 120 ч; (В) Гистограмма распределения: Т-лимфоциты и K562-CD19+ (1:1), 48 ч и 120 ч после начала со-культивирования; (Г) Динамика изменения процентного соотношения Т-лимфоцитов и клеток K562-CD19+ (1:1) при со-культивировании, 48 ч и 120 ч

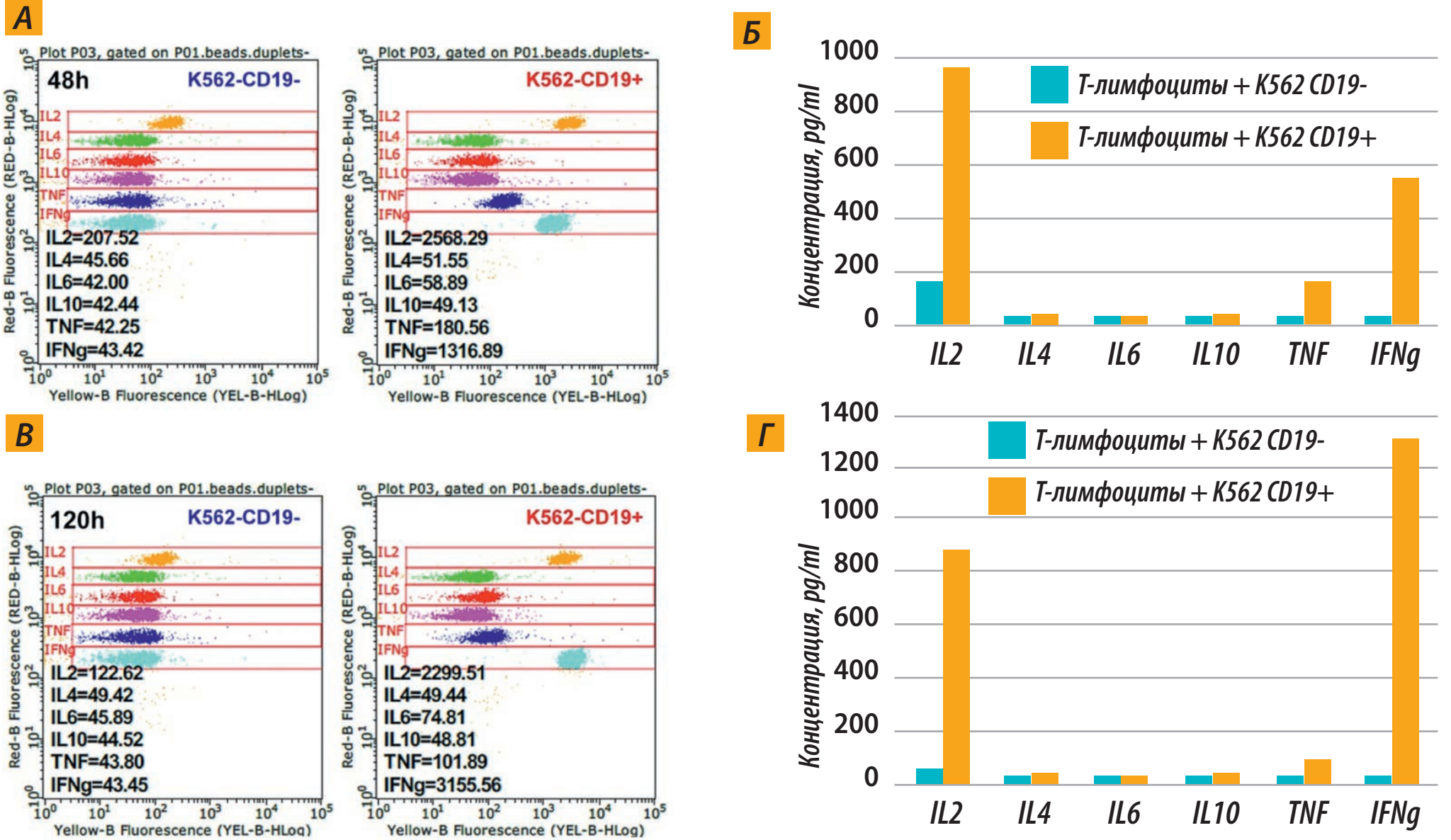


Рис. 4. Уровень экспрессии цитокинов при со-культивировании CAR-T-лимфоцитов с клетками-мишенями линии K562-CD19+/-, оценка методом проточной цитометрии. (А, Б) Экспозиция 48 ч; (В, Г) Экспозиция 120 ч