

ВЫБОР НАИБОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНЫХ АНТИ-В7-Н3 ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Д. В. Луцкович, А. Н. Мелешко

РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Республика Беларусь

Введение. Нейробластома – редкое онкологическое заболевание, которое поражает преимущественно младенцев и детей раннего возраста. Традиционные методы лечения, такие как химиотерапия и лучевая терапия, показали ограниченный успех в лечении нейробластомы высокой группы риска. Новый подход клеточной иммунотерапии, известный как терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR) открывает новые возможности терапии лейкозов и солидных опухолей. Одним из наиболее изученных мишеней для CAR-T терапии солидных опухолей является белок CD276 (B7-H3).

Цель. Получение двух вариантов анти-B7-H3 CAR-T клеток функционально активных в отношении нейробластомы человека.

Материалы и методы исследования. Синтетические последовательности ДНК рецептора (Synbio, Китай) были клонированы в лентивирусный вектор pWPXL методом рестрикции и лигирования. Получение лентивирусных частиц проведено путем ко-трансфекции клеток HEK293T. Выделение Т-клеток производили коммерческим набором EasySep (ThermoFisher) из периферической крови донора путем отрицательной селекции. Активацию Т-клеток производили частицами CD3/CD28 Dynabeads (ThermoFisher). Трансдукцию активированных Т-клеток производили при помощи RetroNectin (TakaraClontech, США) с множественностью инфекции 10. Т-клетки культивировали в среде RPMI с L-глутамином с добавлением 10% эмбриональной телячьей сывороткой и 300U ИЛ-2. Для постановки функционального (цитотоксического) теста (ЦТТ) использовали B7-H3 положительные клетки-мишени нейробластомы человека – SK-N-BE(2) и две остеосаркомы человека – KHOS и 143B окрашенные CellTrace™ для отделения мишеней от эффекторов, с добавлением витального красителя 7AAD для окраски мертвых клеток. ЦТТ анализировался в трех соотношениях 2:1, 1:1 и 1:2 эффектор:мишень. Отрицательным контролем выступали не трансдуцированные Т-лимфоциты (МОСК). Цитотоксическая активность рассчитывалась как разница клеток в тесте с CAR и МОСК контролем.

Результаты. Было получено два варианта CAR-T второго поколения с одним антигенсвязывающим антительным доменом (8H9) к мишени B7-H3, первый вариант с дополнительными вставочными доменами иммуноглобулина CH2-CH3 (8H9L), второй без (8H9S). Функциональный титр лентивирусных частиц составил: для 8H9L – 7×10^7 , для 8H9S – $7,2 \times 10^7$ на мл. Популяционный состав исходного Т-клеточного продукта составил: Tnaive+Tscm – 33,5%, Tcm – 59,7%, Tem+TeffRA – 6,7%. Соотношения CD4 и CD8 50%. Эффективность трансдукции составила: 8H9L – 30,7%, 8H9S – 35,5%. Эффективность цитотоксического теста против клеток SK-N-BE(2) составила: для рецептора 8H9L – 2,1%, 2,6% и 21% при соотношениях 2:1, 1:1 и 1:2, соответственно. С рецептором 8H9S – 55,1%, 55,9% и 57,2%. Эффективность цитотоксического теста против клеток KHOS составила: для рецептора 8H9L – 11,1%, 13,2% и 9% при соотношениях 2:1, 1:1 и 1:2, соответственно. С рецептором 8H9S – 33,7%, 38,1% и 30,5%. Эффективность цитотоксического теста против клеток 143B составила: для рецептора 8H9L – 24%, 32,4% и 26,5% при соотношениях 2:1, 1:1 и 1:2, соответственно. С рецептором 8H9S – 50%, 47,9% и 46,3%.

Заключение. Наиболее высокой цитотоксической активностью обладает вариант анти-B7-H3 CAR-T клеток без дополнительных вставочных доменов против B7-H3+ клеточных линий. Различия в эффективности на разных клеточных линиях объясняется плотностью антигена.