

**Конструирование и оценка функциональной активности химерного антигенного рецептора к белку CD19 человека**  
РНПЦ Детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Республика Беларусь

На протяжении длительного периода времени основными методами борьбы со злокачественными новообразованиями остаются хирургия, химиотерапия и лучевая терапия. Тем не менее, успехи последних двадцати лет в области противоопухолевой иммунотерапии привели к бурному росту количества исследований и клинических испытаний по данной тематике. Среди различных классов иммунотерапии рака, включая моноклональные антитела к ингибиторам рецепторов контрольных точек, цитокины, активирующие лимфоциты, противораковые вакцины, онколитические вирусы и биспецифические антитела, адоптивная Т-клеточная терапия становится революционным методом борьбы со злокачественными новообразованиями. Т-клетки, генетически модифицированные для экспрессии химерных антигенных рецепторов (CAR Т-клетки), специфичные к В-лимфоцитарному антигену CD19 человека, продемонстрировали беспрецедентные результаты при лечении рецидивирующих или рефрактерных В-клеточных злокачественных новообразований.

**Цель работы:** сконструировать и провести оценку *in vitro* функциональной активности химерных антигенных рецепторов (CAR) второго поколения с коротким, либо длинным шарнирным регионом, таргетирующих белок CD19 человека.

**Материалы и методы.** Оценка специфичности распознавания целевого антигена CD19, а также эффективности активации CD4<sup>+</sup> Т-клеток проводили с использованием двух вариантов генетически модифицированной иммортализованной клеточной линии *Jurkat*, экспрессирующих разработанные нами CAR второго поколения (antiCD19-CD28-4-1BB-CD3zeta) с коротким (CAR\_S) и длинным (CAR\_L) шарнирными участками. Полученные путем лентивирусной трансдукции генетически-модифицированные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты донора, экспрессирующие соответствующие варианты CAR, использовали для оценки специфической цитотоксической активности. Продолжительность экспансии CD8<sup>+</sup> Т-клеток составила 9 суток. Клетки

инкубировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% ЭТС, а также цитокинов ИЛ7 и ИЛ15. В качестве МОСК контролей использовали клетки линии *Jurkat* и CD8<sup>+</sup> Т-клетки донора, не подвергшиеся генетической модификации. В качестве клеток-мишеней использовали генетически-модифицированную линию *K562* с эктопической экспрессией белка CD19 человека. Соотношение эффектор/мишень в тестах *in vitro* составило 1 к 1. Продолжительность инкубации в тесте на активацию составила 16 часов, в цитотоксическом тесте – 4 часа. Уровень специфической активации CD4<sup>+</sup> Т-клеток определяли по экспрессии молекулы CD69. Специфическую цитотоксическую активность CD8<sup>+</sup> Т-клеток определяли по проценту лизированных клеток-мишеней.

**Результаты и выводы.** Эффективность активации CD4<sup>+</sup> Т-клеток линии *Jurkat\_CAR* была значительно выше для варианта *CAR\_S* (73 %), чем для варианта *CAR\_L* (3 %). Содержание CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с фенотипом стволовых Т-клеток памяти (CD45RA<sup>+</sup>/ CCR7<sup>+</sup>/ CD62L<sup>+</sup>/ CD95<sup>high</sup>) в конечном клеточном продукте составило 67 %. Общий прирост клеточной массы составил более 18 раз. Абсолютный прирост стволовых Т-клеток памяти составил 660 раз. Нормализованная по МОСК контролю специфическая цитотоксическая активность CD8<sup>+</sup> *CAR* Т-клеток для варианта с коротким шарнирным регионом составила 20%, с длинным – 23%.

**Заключение.** Оценка специфической активации и цитотоксической активности полученных Т-клеток, экспрессирующих на своей поверхности сконструированный нами *CAR*, показала, что оба варианта рецептора (с коротким или длинным шарнирными регионами) являются работоспособными, и в перспективе могут быть использованы для целей адоптивной *CAR* Т-клеточной иммунотерапии В-линейных лейкозов и лимфом.