

Д. В. ЛУЦКОВИЧ¹, А.-М. В. ЕРОФЕЕВА², М. А. КОРНЕЕВА², Е. С. ЛУЦКОВИЧ¹,
С. В. МАНЬКОВСКАЯ², Д. О. ДОРМЕШКИН³, А. Н. МЕЛЕШКО¹

ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИ-GD2 CAR-T ТЕРАПИИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

¹ Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», д. Боровляны, Республика Беларусь

² Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

³ Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

Цель – получить химерные антигенные рецепторы 2-го поколения и оценить их функциональную активность в сингенной мышинной модели нейробластомы для обоснования дальнейших клинических испытаний.

В данном исследовании в качестве мишеней для таргетирования CAR-T клетками были выбраны дисиаialogанглиозид GD2 и его ацетилированная форма. Внутривенная инфузия CAR-T клеток в терапевтической дозе ($7,5 \times 10^4$) независимо от типа применяемого антитела хорошо переносилась животными с экспериментальной нейробластомой. На 30 день обнаружены признаки регрессии сформированного опухолевого узла: дистрофия и апоптоз клеток, формирование полей некроза и развитие очагов грануляционной ткани. Отмечено, что контроль объема опухолевого узла был более выражен при использовании CAR-T 8B6-BBz.

Ключевые слова: нейробластома, сингенная модель, CAR-T.

Введение. Нейробластома (НБ) является наиболее распространенной внечерепной солидной опухолью у детей, на ее долю приходится 7 % всех детских новообразований у пациентов в возрасте до 15 лет и 15 % всех детских смертей от рака в мире. Это второй по распространенности тип детских солидных опухолей, уступающий только опухолям центральной нервной системы (ЦНС) и третий после лейкемии, опухолей головного мозга по уровню заболеваемости среди детских опухолевых заболеваний. Мировые показатели смертности составляют 0,85–1,1 случая на 100 000 детей в возрасте до 15 лет [1].

В последние годы были достигнуты определенные успехи в терапии НБ, в первую очередь за счет внедрения новых терапевтических подходов. Пациенты с нейробластомой группы низкого и среднего риска имеют благоприятный прогноз и пятилетнюю выживаемость более 90 %. Однако в случае нейробластомы группы высокого риска, которая выявляется примерно в 60 % случаев, прогноз остается неблагоприятным. Несмотря на агрессивную мультимодальную терапию, пятилетняя выживаемость остается ниже 50 % [2]. Химиотерапия, лучевая терапия и хирургические методы демонстрируют более низкую эффективность на поздних стадиях лечения заболевания при возникновении рефрактерности, а также обладают заметной токсичностью, в том числе возрастание риска возникновения вторичных опухолей.

Иммунотерапия представляет собой перспективный подход в лечении нейробластомы группы высокого риска. В настоящее время все больше популярность набирает терапия Т-лимфоцитами, экспрессирующая трансгенный рецептор Т-клеток или химерные антигенные рецепторы (CAR). Целевым антигеном для создания CAR-T терапии против нейробластомы является дисиаialogанглиозид GD2 который широко экспрессируется на поверхности этих клеток. Большинство клинических вариантов анти-GD2 CAR основаны на scFv 14.G2a, происходящем из химерного антитела 14.18 (денутуксимаб). Экспрессия GD2 очень типичная для

злокачественных нейробластов, но встречается и на периферических нервах, меланоцитах кожи, мозге и остеопрогениторах [3].

Одним из вариантов увеличения специфичности рецептора является таргетирование О-ацетил-GD2, производное дисиалоганглиозида, в котором внешний остаток сиаловой кислоты модифицирован О-ацетиловым эфиром. Ацетилирование GD2 происходит только в опухолевых клетках и не встречается в периферических нервах [4, 5]. Известно mAb 8B6 специфичное именно к О-ацетил-GD2, для которого показана диагностическая ценность в распознавании материала нейробластомы и меланомы методом иммуногистохимии [6]. Плотность экспрессии О-ацетил-GD2 на опухолевых клетках ниже, чем для GD2: от 10 % до 50 % молекул GD2 ацетилировано [7]. Таким образом, GD2 и О-ацетил GD2 являются подходящими мишенями для CAR-T терапии нейробластомы. Опубликованы результаты отдельных клинических испытаний для CAR-T на основе 14G2a, но пока отсутствуют данные по использованию антитела 8B6 в составе CAR [8]. Дизайны и результаты клинических испытаний CAR-T терапии для лечения нейробластомы исчерпывающе описаны в недавнем обзоре [9].

Доклинические исследования *in vivo* для новых методов клеточной терапии, в том числе CAR-T терапии, обычно требуются для обоснования клинических испытаний. Для CAR-T терапии наиболее распространены ксенографтные модели в иммунодефицитных мышах, которые позволяют испытывать CAR-T лимфоциты против опухолевых клеток человека. Сингенные, т.е. полностью мышинные модели, позволяют изучать отношения опухоли и CAR-T в контексте функциональной иммунной системы, естественного микроокружения опухоли. Сингенные модели имеют ряд недостатков и преимуществ, но остаются актуальной экспериментальной моделью этого вида терапии [10, 11].

Цель настоящего исследования: получить химерные антигенные рецепторы 2-го поколения и оценить их функциональную активность в сингенной мышинной модели нейробластомы для обоснования дальнейших клинических испытаний.

Материалы и методы исследования. Клеточные линии. В работе были использованы следующие иммортализованные клеточные линии: 293T (ATCC CRL-3216), полученной из клеток эмбриональных почек человека, для получения лентивирусных частиц и NXS2 клеточная линия мышинной нейробластомы GD2 положительная. Идентичность всех клеточных линий была проверена путем генотипирования STR полиморфизмов. Отсутствие контаминации микоплазмы контролировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Экспериментальные животные. Исследование проведено на 20 мышах линии A/J в возрасте 6–8 недель. Мыши содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище и циклом день/ночь 12/12 ч. Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике при Институте физиологии НАН Беларуси (№ 1 от 26.01.23).

Сборка конструкции CAR. Сборка конструкций осуществлялась методом рестрикции и лигирования на основе вектора pCLNCX. Синтетические последовательности ДНК scFv и компонентов CAR были заказаны в компании Synbio Technologies (США). Собранные последовательности рецепторов были клонированы по сайтам рестрикции ClaI и HindIII (NEB) в вектор pCLNCX и трансформированы в компетентные клетки XL10 Gold. Полученные бактериальные колонии проверялись методом ПЦР с конструкт-специфичными праймерами. Плазмидную ДНК выделяли коммерческим набором NucleoBond® Xtra Maxi MN (Германия) из ночной культуры бактерий, содержащих полную последовательность клонированной конструкции. Проверку правильности собранной конструкции проверяли рестрикционным картированием плазмидной ДНК и с помощью автоматического секвенирования по Сэнгеру на генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (Thermo Scientific, США) с использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США).

Получение CAR-T клеток. В качестве исходного материала использовали фильтрат клеток из селезенки здоровой мыши. Фракцию мононуклеарных клеток выделяли путем центрифугирования на градиент плотности с подсчетом в растворе 3 % уксусной кислоты в камере Горяева и концентрировали до 1×10^6 /мл. Т-клетки выделяли путем негативной

иммуномагнитной селекции CD3⁺ клеток по инструкции набора EasySep™ Mouse T Cell Isolation Kit (StemCell Technologies, Канада), считали в камере Горяева количество и жизнеспособность клеток в 0,4 % растворе трипанового синего. Активация клеток перед трансдукцией обеспечивали магнитными частицами CD3/CD28 (Dynabeads™ Mouse T-Activator CD3/CD28, Thermo Fisher Scientific, США) в течение 48 часов в среде Gibco RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 1х антибиотика-антимикотика, 500 IU ИЛ-2/мл, 50 μМ В-меркаптоэтанол, 1× раствора незаменимых аминокислот и 1× раствора пирувата натрия. Спустя 48 часов после активации производили ретровирусную трансдукцию Т-клеток при соотношении 1 мл вирусного супернатанта на 1×10⁶/мл Т-клеток на плашках, обработанных RetroNectin (TakaraClontech, США) со спинокуляцией. Через 24 часа клетки отмывали той же полной средой с цитокинами и продолжали инкубацию *in vitro* в течение 8–12 дней с контролем прироста клеток и экспрессии зеленого флуоресцентного белка (GFP) на 10–12 день. В экспериментах в качестве контроля использовали нетрансдуцированные активированные лимфоциты.

Модель мышинной опухоли. Приживление опухоли проводили однократно в область бедра путем подкожной инъекции суспензии клеток NXS2 в количестве 1,5×10⁶ и в 300 мкл фосфатно-солевого буфера [8]. Для оценки динамики роста опухоли раз в 5 дней измеряли объем опухоли с помощью цифрового калипера для определения объема опухоли (ширина × длина × ширина × π/6 = мм³).

Инфузия CAR-T клеток. CAR-T клетки вводили однократно в хвостовую вену. В качестве контроля эффективности использовали немодифицированные Т-клетки в количестве пропорционально введенных CAR-T.

Морфологические исследования. Для изучения морфологической характеристики опухоли выполняли вскрытие животных на 30 день после введения CAR-T клеток. Иссеченные опухолевые узлы фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов с последующей заливкой парафин и изготовлением серийных срезов толщиной 3 мкм для обзорной микроскопии. Окрашенные гематоксилином и эозином препараты исследовали с помощью микроскопа Ортес ВК 5000 (КНР).

Результаты и их обсуждение. *Экспрессия GD2 на клетках NXS2.* Экспрессию GD2 на клеточной линии мышинной нейробластомы NXS2 оценили с помощью проточной цитометрии. Клеточная линия была на 95 % положительная по GD2 и при оценке была выявлена высокая интенсивность экспрессии (ΔMFI = 2×10⁵, рисунок 1).

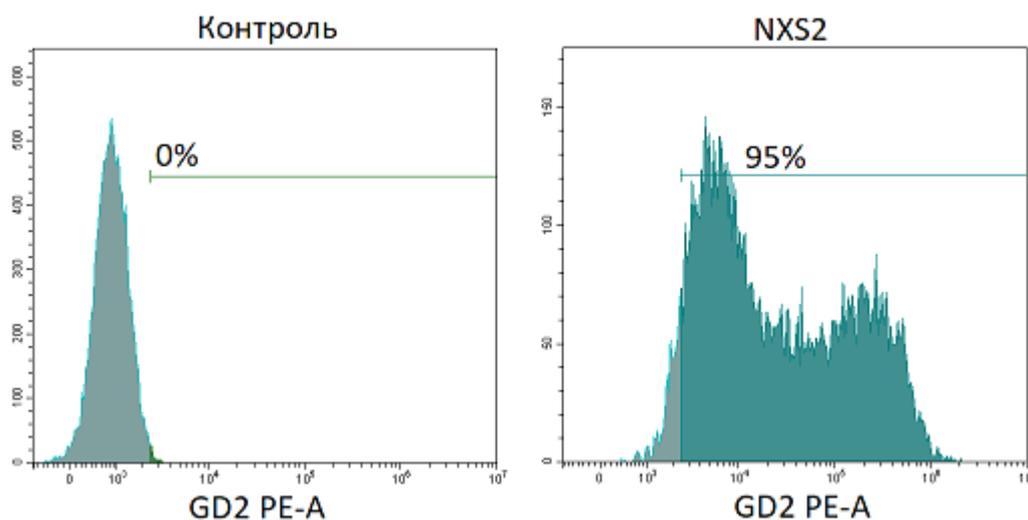


Рисунок 1. Экспрессия GD2 на клеточной линии нейробластомы мыши NXS2

Дизайн химерных антигенных рецепторов. Было разработано 2 варианта анти-GD2 конструкций CAR второго поколения, с включением в качестве антиген-распознающего домена scFv двух моноклональных антител – ch14.18 (scFv 14G2a) и 8B6. Все варианты рецепторов включали шарнирный регион IgG4, мышинный трансмембранный домен CD28TM, мышинный внутриклеточный костимуляторный домен 4-1BB и мышинный сигнальный домен CD3 ζ . (рисунок 2).

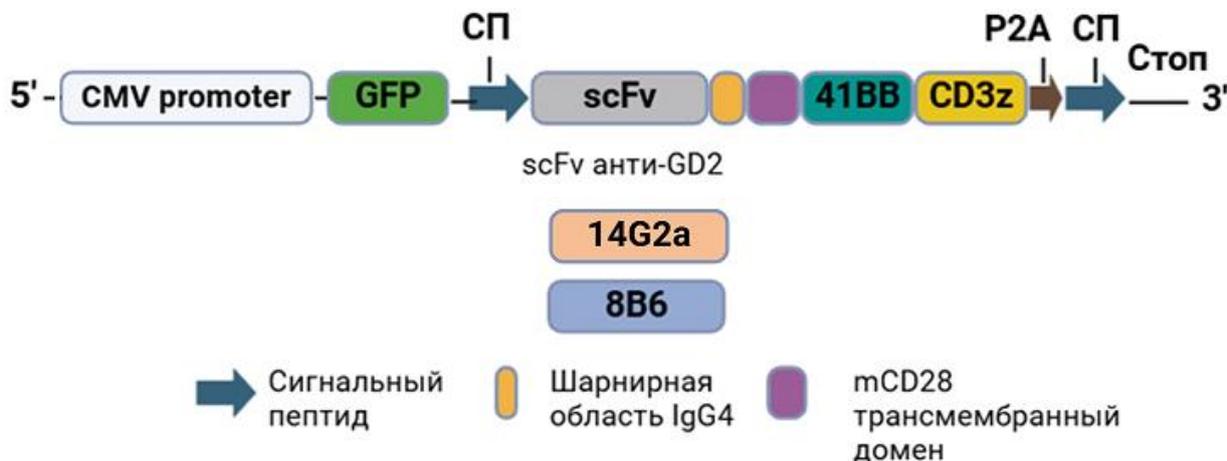


Рисунок 2. Схема конструкции анти-GD2 CAR используемых в этой работе

Проверка *in vitro* функциональной активности мышинных анти-GD2 CAR -T. Прямой цитотоксический тест проводили в соотношениях мишень: эффектор = 1 : 1 и 1 : 3 с двумя вариантами CAR-T. Для представления CAR-зависимой цитотоксичности конечные результаты рассчитывались как разница цитотоксической активности CAR-T и соответствующего ему нетрансдуцированному контролю (рисунок 3).

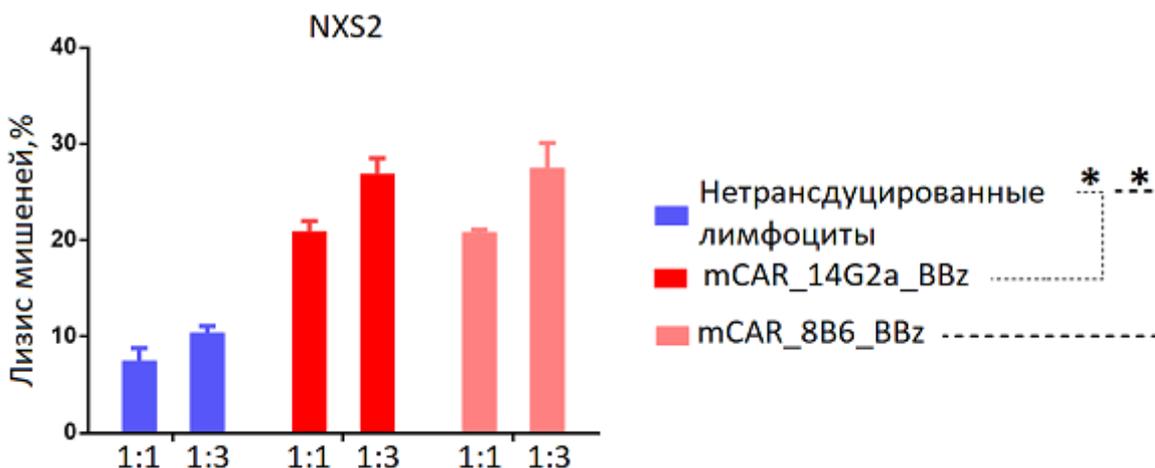


Рисунок 3. Сравнение цитотоксической активности двух вариантов CAR-T_Anti-GD2 против клеточной линии NXS2 в двух разных соотношениях; * – $p < 0,05$

Все варианты CAR-T показали выраженную дозозависимую цитотоксическую активность против GD2⁺ клеточной линии NXS2. Статистически значимых различий между рецепторами не наблюдали.

Проверка *in vivo* функциональной активности мышинного анти-GD2 CAR-T. В эксперимент было взято 20 мышей линии A/J. Две группы экспериментальные – по 4 самца и 4 самки в каждой, одна – контрольная (2 самца и 2 самки). Всем животным проведена прививка стандартной клеточной линии мышинной нейробластомы NXS2.

На 7 день после прививания опухоли всем подопытным произведена внутрибрюшинная инфузия циклофосфана (200 мг/кг).

На 11 день после прививания опухоли произведена внутривенная инфузия двух вариантов модифицированных лимфоцитов (CAR-T 14G2a-BBz и 8B6-BBz). Количество CAR-T на одну мышь составило $7,5 \times 10^4$. Объем вводимого клеточного биологического препарата составил 300 мкл. В качестве отрицательного контроля четырем подопытным мышам из каждой группы вводили активированные не модифицированные лимфоциты в количестве 1×10^6 на одну мышь (пропорционально рассчитанное количество, исходя из вводимой дозы CAR-T).

Для оценки динамики роста раз в 5 дней измеряли объем опухоли с помощью цифрового калипера. Результаты представлены на рисунке 4.

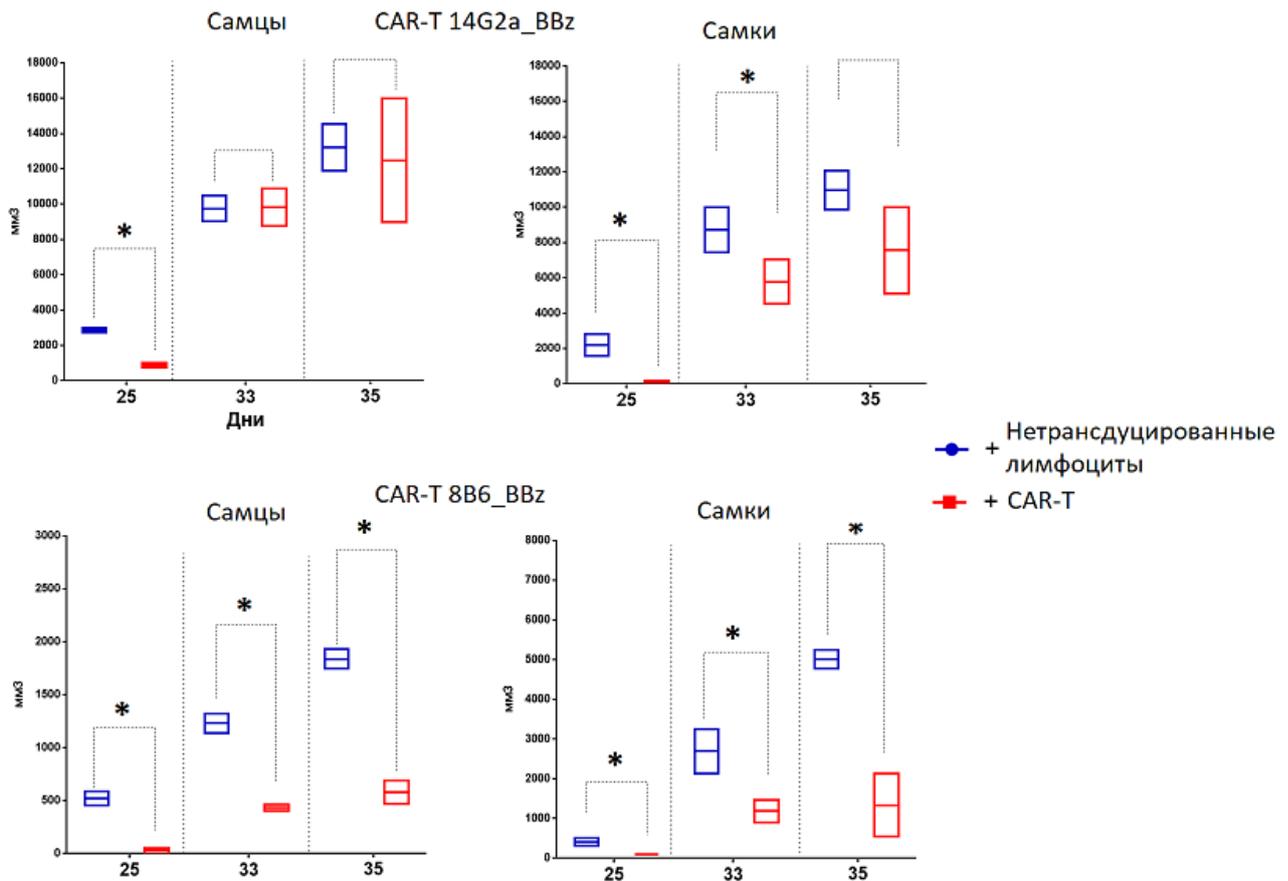
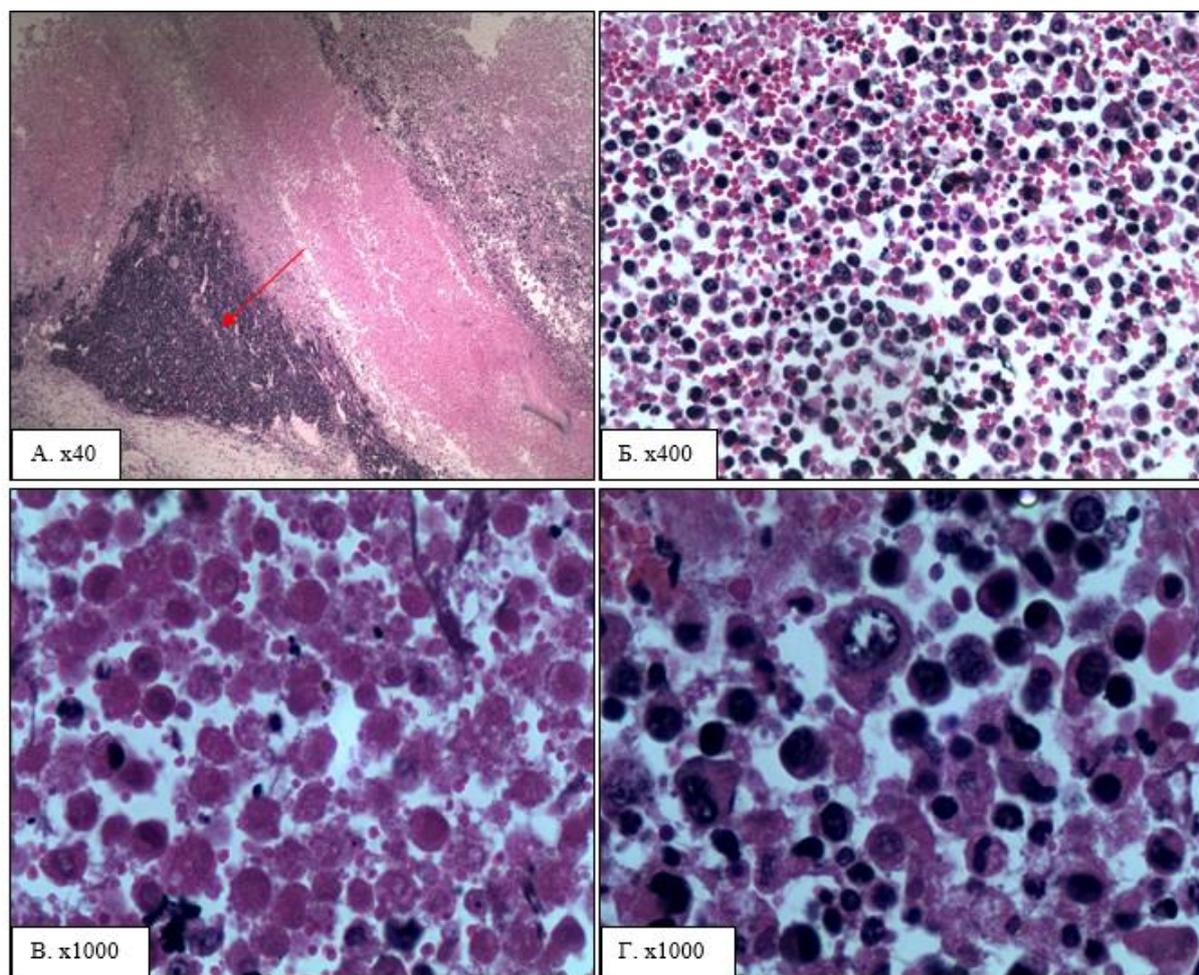


Рисунок 4. Сравнение цитотоксической активности двух вариантов CAR-T_Anti-GD2 против клеточной линии NXS2 в двух разных соотношениях; * – $p < 0,05$

Установлено, что оба варианта CAR-T клеток сдерживали рост опухолевого узла по сравнению с нередуцированными клетками. Примечательным является то, что CAR-T 14G2a-BBz лучше контролировал рост опухолевого узла у самок, до 30 дня, а CAR-T 8B6-BBz контролировал рост опухолевого узла одинаково для самцов и самок вплоть до 40 дня.

Таким образом, мы также предварительно ответили на вопрос, насколько высокую аффинность к антигену должен иметь CAR для реализации наибольшего эффекта. Известно, что наибольшей аффинностью обладает 14G2a ($KD=77\text{нМ}$ или 49 [12,13]), а антитело 8B6 обладает более низкой аффинностью ($KD=32$ [12]), но является более привлекательным из-за более высокой специфичности распознавания ацетилированной формы GD2, характерной для опухолевых клеток, но не периферических нервов [12].

На 30 день после введения CAR-T произвели морфологический анализ опухоли (рисунок 5).



А – обзорная микроскопия опухолевого узла, стрелкой указана жизнеспособная ткань;
Б, В, Г – цитология опухолевых клеток в зоне регрессии

Рисунок 5. Микроскопическая структура опухолевого узла на 30 день после введения клеток NXS2 и 14 день после введения CAR-T 8B6-BBz

Для всех вариантов CAR-T в центральных отделах опухоли наблюдали признаки регрессивных изменений, на долю которых приходится более 50 % всей площади: опухолевая паренхима сохранилась в виде разрозненных групп клеток или одиночных клеток с выраженными дистрофическими изменениями среди свободнолежащих эритроцитов. Присутствовали клетки с пикнотическими ядрами, клетки с фрагментированными по всей цитоплазме ядрами, местами с образованием клеток-теней. Также встречались единичные гигантские клетки с уродливыми гиперхромными ядрами или причудливыми ядерными образованиями. Митозы в клетках отсутствовали. Очагово прослеживалось разрастание грануляционной ткани.

Заключение. В данном исследовании в качестве мишеней для таргетирования CAR-T клетками были выбраны дисialogанглиозид GD2 и его ацетилированная форма. Внутривенная инфузия CAR-T клеток в терапевтической дозе ($7,5 \times 10^4$) независимо от типа применяемого антитела хорошо переносилась животными (отсутствовали визуальные побочные эффекты) с экспериментальной нейробластомой. На 30 день выявили признаки регрессивных изменений сформированного опухолевого узла. Контроль объема опухолевого узла был более выражен при использовании CAR-T 8B6-BBz.

Таким образом, в экспериментах *in vivo* установлен цитотоксический эффект CAR-T клеток различных модификаций в отношении первичного опухолевого очага нейробластомы и отсутствие кардинальных побочных эффектов, что является основой для проведения клинических испытаний этой клеточной терапии при данной патологии.

Литература:

- [1]. *Maris J.M., Hogarty M.D., Bagatell R. et al.* Neuroblastoma. *Lancet*. 2007. Vol. 369. № 9579. P.2106–2120.
- [2]. *Whittle S.B., Smith V., Doherty E. et al.* Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2017. Vol. 17. № 4. P. 369–386.
- [3]. *Nazha B., Inal C., Owonikoko T.K.* Disialoganglioside GD2 Expression in Solid Tumors and Role as a Target for Cancer Therapy. *Front. Oncol.* 2020. Vol. 10. P. 1–15.
- [4]. *Faraj S., Bahri M., Fougeray S. et al.* Neuroblastoma chemotherapy can be augmented by immunotargeting O-acetyl-GD2 tumor-associated ganglioside. *Oncoimmunology*. 2018. Vol. 7. P. 1–13.
- [5]. *Cavdarli S., Delannoy P., Groux-Degroote S.* O-acetylated Gangliosides as Targets for Cancer Immunotherapy. *Cells* 2020. Vol. 9. P. 1–14.
- [6]. *Alvarez-Rueda N., Desselle A., Cochonneau D. et al.* A monoclonal antibody to O-Acetyl-GD2 ganglioside and not to GD2 shows potent anti-tumor activity without peripheral nervous system cross-reactivity. *PLoS One*. 2011. Vol. 6. P.1–12.
- [7]. *Fleurence J., Fougeray S., Bahri M. et al.* Targeting O-Acetyl-GD2 Ganglioside for Cancer Immunotherapy. *J. Immunol. Res.* 2017. Vol. 2017. № 5604891.
- [8]. *Del Bufalo F., De Angelis B., Caruana I. et al.* GD2-CART01 for Relapsed or Refractory High-Risk Neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* 2023. Vol. 388 № 14. P. 1284–1295.
- [9]. *Lutskovich D., Meleshko A., Katsin M.* State of the art and perspectives of chimeric antigen receptor T cells cell therapy for neuroblastoma. *Cytotherapy*. 2024. Vol. 26. № 10. P. 1122–1131.
- [10]. *Duncan B.B., Dunbar C.E., Ishii K.* Applying a clinical lens to animal models of CAR-T cell therapies. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2022. Vol. 30. № 27. P. 17–31.
- [11]. *Д.В. Луцкович, А.-М.В. Ерофеева, М.А. Корнеева и др.* Сингенная модель нейробластомы // *Новости медико-биологических наук*. 2024 Т. 24. № 2. С. 40–46.
- [12]. *Alvarez-Rueda N., Desselle A., Cochonneau D. et al.* A monoclonal antibody to O-Acetyl-GD2 ganglioside and not to GD2 shows potent anti-tumor activity without peripheral nervous system cross-reactivity. *PLoS One*. 2011. Vol. 6. P. 1–12.
- [13]. *Mao R., Kong W., He Y.* The affinity of antigen-binding domain on the antitumor efficacy of CAR T cells: Moderate is better. *Front Immunol* 2022. Vol. 13. P. 1–15.

*D. V. LUTSKOVICH¹, A.-M. V. YEROFEYEVA², M. A. KORNEEVA², K. S. LUTSKOVICH¹,
S. V. MANKOVSKAYA², D. O. DORMESHKIN³, A. N. MELESHKO¹*

A SYNGENEIC MOUSE MODEL OF ANTI-GD2 CAR-T THERAPY FOR NEUROBLASTOMA

¹ *State Institution “Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology”,
Borovlyany, Republic of Belarus*

² *State Scientific Institution “Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus”, Minsk,
Republic of Belarus*

³ *State Scientific Institution “Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of
Belarus”, Minsk, Republic of Belarus*

Summary

The aim was to obtain chimeric antigenic receptors of the 2nd generation and evaluate their functional activity in a syngeneic mouse model of neuroblastoma to justify further clinical trials.

In this study, disialoganglioside GD2 and its acetylated form were chosen as targets for CAR-T cell targeting. Intravenous infusion of CAR-T cells at a therapeutic dose (7.5×10^4) regardless of the type of antibody used was well tolerated by animals with experimental neuroblastoma. On the 30th day signs of regression of the formed tumor node were detected: dystrophy, apoptosis of cells, formation of necrosis fields and development of granulation tissue foci. Regressive changes accounted for 50 % to 70 % of the tumor tissue, the severity of morphological signs gradually decreased from the center to the periphery of the neoplasm. It was noted that control of tumor node volume was more pronounced with CAR-T 8B6-BBz.

Keywords: neuroblastoma, syngeneic model, CAR-T.