

плантата наблюдалась у 11 пациентов. Гипофункция разрешилась самостоятельно у семи больных в течение 79 дней (16-470), в остальных случаях было выполнено введение CD34+ клеток (3). Трое из 4 пациентов погибли до приживления: 1 – сепсис *Pseudomonas aeruginosa*, 1 – желудочно-кишечное кровотечение, 1 – первичное неприживление и сепсис. Одна пациентка погибла в результате тромботической микроангиопатии (ТМА) на Д+115. Острая РТПХ 2-4 степени отмечалась у 29% пациентов, острая РТПХ 3-4 степени – 18%. Во всех случаях, кроме одного, острая РТПХ 3-4 степени разрешилась на фоне терапии ингибиторами кальциневрина. Один пациент получал терапию системными глюкокортикоидными препаратами. Хроническая РТПХ средней степени тяжести наблюдалась у 29% пациентов. Переносимость режима кондиционирования и протокол профилактики была удовлетворительная. Токсичность 3-4 степени, в частности токсический гепатит и сепсис, отмечались у 4 и 5 пациентов соответственно. Веноокклюзионная болезнь средней степени тяжести наблюдалась у 1 пациента, ТМА – 1. Реактивация цитомегаловируса отмечалась у 6 пациентов, EBV – 1, HHV 1 и 2 типа – 1, HHV 6 типа – 2, BK вируса – 1, геморрагический цистит – 2.

Двухлетняя общая выживаемость составила 80%. Все пациенты достигли молекулярной, клинико-гематологической ремиссии, полного донорского химеризма. Практически полный регресс фиброза в костном мозге зарегистрирован у 12 пациентов. Ни в одном случае не отмечалось развитие рецидива заболевания. Трансплантационная летальность составила 15% и 20% через 100 дней и 1 год после алло-ТГСК соответственно.

Заключение

Алло-ТГСК является эффективной терапевтической опцией для пациентов с миелофиброзом. Применение в посттрансплантационном периоде циклофосфида в комбинации с руксолитинибом представляется эффективной терапевтической опцией в качестве профилактики РТПХ и рецидива заболевания.

Ключевые слова

Миелофиброз, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, руксолитиниб, реакция «трансплантат против хозяина», профилактика, циклофосфамид.

Comparative *in vitro* analysis of human NK-cell lines expressing chimeric antigen receptors

Tatyana N. Belovezhets^{1,2}, Andrey A. Gorchakov^{1,2}, Sergey V. Kulemzin¹, Anton N. Chikaev¹, Olga A. Koval^{1,3}, Elena V. Kuligina³, Aleksander V. Taranin^{1,2}

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

Contact: Tatyana N. Belovezhets

E-mail: ochotanya@gmail.com

Introduction

CAR T cell therapy received regulatory approval for treatment of pediatric r/rALL patients in August, 2017. Despite impressive efficacy, widespread use of CAR T cell therapy is limited by prohibitively high costs, complex standardization procedures, as well as by inherent difficulties to produce CAR T cell products for certain groups of patients. Moving CAR T cell therapy from autologous to allogeneic format appears highly attractive, yet challenging, as current techniques of cell sorting and genome engineering may do not entirely eliminate the risk of GvHD. Choosing immortalized human NK-cell lines over T cells as CAR carriers offers a possible solution to this problem. Such cell lines are inexpensive to maintain, they do not cause GvHD, and are straightforward to standardize. Several human NK-cell lines have been described to date, however no side-by-side comparisons of activity of such cells engineered to express CARs have been performed.

Methods

In this study, three immortalized human NK-cell line back-

grounds (A, B, and NK-92) were used to establish sublines expressing a CD20-specific CAR. *In vitro* cytotoxicity assays of parental and CAR-expressing cells against CD20-positive Burkitt lymphoma target cells (Raji) were performed. Alternative target cells (HEK293T(CD20+)) and non-target isogenic controls (HEK293T) were also included into cytotoxicity tests.

Results

All the three CAR-NK cell lines obtained displayed pronounced cytotoxicity against Raji target cells, however this cell line was also highly sensitive to killing by unmodified parental NK-92 cells. Thus, in order to perform side-by-side comparisons of CAR-NK cell activity *in vitro*, we established HEK293T cells overexpressing CD20, as the target cell line. The level of non-specific cytotoxicity of parental NK-cell lines against HEK293T(CD20+) cells was below 20% across the E:T ratios ranging from 1 to 5, whereas specific CAR-mediated cytotoxicity at E:T=5 constituted 73% (CAR-NK-92), 55% (CAR-B), and 34% (CAR-A).

Conclusion

All the CAR-NK cell lines obtained in this study display significant cell killing activity towards target cells *in vitro*, with NK-92 cell line showing the highest level of both specific and non-specific cytotoxicity. Further studies *in vivo* are needed to explore the safety and efficacy profiles of CAR-NK cell lines.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, grant agreement №14.604.21.0169(uniqueprojectidentifierRFMEFI60417X0169).

Keywords

Chimeric antigen receptors, NK-cell lines, cytotoxicity.

Сравнительный анализ *in vitro* активности НК-клеточных линий человека, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы

Татьяна Н. Беловежец^{1,2}, Андрей А. Горчаков^{1,2}, Сергей В. Кулемзин¹, Антон Н. Чикаев¹, Ольга А. Коваль^{1,3}, Елена В. Кулигина³, Александр В. Таранин^{1,2}

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Введение

Терапия Т-клетками, экспрессирующими химерные антигенные рецепторы (CAR), была одобрена FDA к клиническому использованию в августе 2017 года для больных с *t(8;21) ALL*. Несмотря на значительную эффективность, у CAR Т-клеточной терапии существуют серьезные ограничения, связанные с высокой стоимостью, сложной стандартизацией и невозможностью получить CAR Т-клетки для отдельных пациентов. В связи с этим крайне привлекательным выглядит создание универсальных аллогенных CAR Т-клеток, однако на существующем уровне развития инструментов геномного редактирования и селекции субпопуляций Т-клеток этот подход сопровождается риском развития реакции «трансплантат против хозяина». Возможным решением этих проблем может быть переход к иммортализованным НК-клеточным линиям в качестве носителей CAR. Подобные линии недорогие в наработке, могут быть стандартизованы и не вызывают реакцию «трансплантат против хозяина». К настоящему моменту описано несколько НК-клеточных линий человека, однако систематического сравнения их свойств в качестве носителей CAR проведено не было.

Методы

В данное исследование были включены три НК-клеточные иммортализованные линии человека (А, В и NK-92). На основе каждой из трех линий методом лентивирусной трансдукции были получены сублинии, стабильно экспрессирующие CAR, специфичный к белку человека CD20. После этого был измерен уровень цитотоксичности CAR-NK клеточных линий по отношению к CD20-положительным клеткам линии Raji (клетки лимфомы Бёркитта) и клеткам линии HEK293T, эктопически экспрессирующим CD20, либо изогенным контрольным клеткам.

Результаты

Все три полученные CAR-NK-клеточные линии обнаруживали значимый уровень цитотоксичности против клеток линии Raji, однако клетки NK-92 дикого типа также лизировали мишени Raji. В связи с этим, для более корректного сравнения уровней цитотоксичности CAR-NK-клеточных линий в тестах *in vitro* были получены клетки линии HEK293T, экспрессирующие CD20. Уровень неспецифической цитотоксичности немодифицированных NK клеток против таких мишеней не превышал 20% в диапазоне эффектор: мишень=1-5, при этом уровень специфической, CAR-опосредованной цитотоксичности составлял 73% (CAR-NK-92), 55% (CAR-B) и 34% (CAR-A) при соотношении эффектор: мишень=5.

Заключение

Все полученные CAR-NK-клеточные линии проявляют значимый уровень цитотоксичности по отношению к CD20-позитивным клеткам-мишеням в тестах *in vitro*, и клетки линии NK-92 проявляют самый высокий уровень как специфической, так и неспецифической цитотоксичности. Необходимы дополнительные исследования *in vivo*, чтобы определить профили безопасности и эффективности CAR-NK эффекторов.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ, соглашение № 14.604.21.0169 (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60417X0169).

Ключевые слова

Химерный антигенный рецептор, НК-клеточные линии, цитотоксичность.