

взаимодействий и способны к переносу различных биополимеров, которые также потенциально могут оказать влияние на интерпретацию оценки минимальной остаточной болезни. Поскольку основная роль в регуляции гемопоэза принадлежит мезенхимным стромальным клеткам (МСК) костного мозга, мы предполагаем, что возможным источником выявляемого транскрипта онкогена могут в том числе выступать как персистирующие в костном мозге экзосомы, так и их миграция в клетки стромального микроокружения.

Объекты и методы

Выделение экзосом производили методом дифференциального ультрацентрифугирования кондиционной среды культуры клеток хронического миелоидного лейкоза линии K562. Полученные частицы анализировали методом лазерной корреляционной спектроскопии. Для проверки стабильности частиц и способности их взаимодействия с биологическими системами был определен Дзета-потенциал. Эксперимент по переносу химерного транскрипта проводился в 24-луночном планшете. После этого вносили 300 мкл бессывороточной питательной ростовой среды с экзосомами (выделенных с порядка 70 млн клеток на лунку).

Кокультивирование K562 и МСК проводили в 24-луночном планшете с полунепроницаемыми перегородками (диаметр пор – 0,4 мкм).

Результаты

Наибольшее количество везикул в пробе соответствует размерам экзосом. Результаты исследования показали, что распределение среднего размера проб по диаметру находится в диапазоне 51,8÷107,0 нм со средним зна-

чением 78,96±20,03 нм. Дзета-потенциал соответствует стабильным частицам и в среднем равен – 29,3±7,4 мВ. По результатам количественной ПЦР в режиме реального времени содержание химерного транскрипта *BCR-ABL p210* в экзосомах колебалось в интервале 44÷864 копий/мл кондиционной среды со значением медианы 154 копии. После кокультивирования K562 и МСК относительное содержание *BCR-ABL p210* в клетках-мишенях стало равным 0,03÷11,4% относительно *ABL1* с медианой в 0,29%. В результате трансфекции экзосомами относительное содержание химерного транскрипта в МСК здоровых доноров находилось в интервале 0,01÷15,88% с медианой 0,11%, что соответствует положительному результату при определении МОБ и доказывает непосредственное участие экзосом в переносе.

Выводы

Экзосомальная фракция микровезикул K562 содержит химерный транскрипт *BCR-ABL p210*, маркер ХМЛ, и способна к его трансферу в МСК костного мозга здоровых доноров, что было определено во время экспериментов совместного культивирования клеток, а также посредством прямой трансфекции экзосомами. Количество транскрипта, перенесенного в стромальные клетки, сравнимо с таковым у пациентов с МОБ, что доказывает потенциальную возможность экзосом вносить вклад в результаты ее определения.

Ключевые слова

Внеклеточные везикулы, экзосомы, опухолеспецифичные экзосомы, стромальные клетки костного мозга, межклеточные взаимодействия.

Study of multipotent mesenchymal stromal cells as a cellular delivery system for antitumor drugs and their remote control activation

Oleksii O. Peltek, Timofey E. Karpov, Yana V. Tarakanichikova, Mikhail V. Zyuzin, Albert R. Muslimov

Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

Contact: Dr. Albert R. Muslimov

E-mail: albert.r.muslimov@gmail.com

Introduction

The effectiveness of a number of cytotoxic drugs directly depends on the concentration of the active substance in the tumor zone. However, an increase in the administered doses also leads to an increase in side effects in relation to healthy tissues. The solution can be a novel dosage form that would accumulate high local concentrations of cytostatic drugs in the tumor area without affecting the surrounding healthy tissue. To create such a drug delivery system, it is possible to utilize multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) modified with hybrid polyelectrolyte microcapsules. MMSCs due to the effect of pathotropism are able to ensure active delivery of biologically active substances to the tumor site, while microcapsules have a high loading capacity and can protect carrier cells from the effects of the encapsulated drug. In this work, the microcapsules were additionally

modified with gold nanoparticles, which makes them sensitive to infrared radiation and allows to control the release of the drug. In this study, vincristine was used as a model drug with a dose-dependent effect.

Objects and methods

Capsules were synthesized using Layer-by-Layer technique (Polyarginine / Dextran sulfate) and sol-gel synthesis (Tetraethyl orthosilicate). The loading capacity of micrometer (1-2 microns) and submicron (500-600 nm) capsules was evaluated. We demonstrated that without an infrared laser irradiation of the capsules, a release of vincristine was less than 10%. Therefore, these capsules are non-toxic to carrier cells which was confirmed by cytotoxicological experiments. The effect of capsules on spontaneous and directed migration of MMSCs was studied and it was shown that at the ratio of cells to capsules of 1 to 10, there is no significant decrease in

the migration potential of carrier cells. Evaluation of spontaneous migration was carried out using scratch wound assay and a monitoring system for living cells Cell-IQ. The effect of vincristine-loaded capsules on directed migration was evaluated using slides for chemotaxis. The invasive potential of MMSC was determined using a Transwell assay. In experiments on directed cell migration, the SDF-1 cytokine, which is expressed by a number of tumors and is considered crucial for the regulation of MMSC migration, was used.

Results

The effectiveness of this delivery system was also investigated on the model of a tumoroid in a collagen gel. The tumor spheroid consisted of melanoma cells expressing SDF-1. It was demonstrated that MMSCs modified with capsules were able to not only migrate towards the tumor site, but also penetrate the tumoroid to a depth of up to 50 μm . Comparison of the efficacy of pure vincristine, vincristine-load-

ed capsules, and MMSCs modified with vincristine-loaded capsules, showed a significant increase in efficiency in the case of MMSC. It was also demonstrated that the exposure of the capsules to infrared radiation increases the effect by 2-4 times due to the simultaneous release of the vincristine from the capsules.

Conclusions

Thus, we developed a drug delivery system that was able to provide high local concentrations of the active substance in the tumor area and demonstrated several times greater *in vitro* efficacy compared to the free drug.

Keywords

Micro- and nanocapsules, targeted delivery antitumor drugs, internalization, mesenchymal stromal cells, migration, pharmacokinetics, synthesis, cultivation, carrier cells.

Изучение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в качестве клеточной системы доставки противоопухолевых препаратов и их дистанционная активация

Алексей А. Пельтек, Тимофей Е. Карпов, Яна В. Тараканчикова, Михаил В. Зюзин, Альберт Р. Муслимов

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Введение

Эффективность ряда цитотоксических препаратов повышается с увеличением концентрации действующего вещества в очаге опухоли. Однако с другой стороны, повышение вводимых доз приводит также к усилению побочных эффектов в отношении здоровых тканей. Решением может служить разработка новой лекарственной формы, которая позволила бы создать высокие локальные концентрации цитостатиков в зоне опухоли, не затрагивая окружающие здоровые ткани. Для создания такой системы доставки лекарственного вещества возможно использование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), модифицированных гибридными полимерными микрокапсулами. ММСК благодаря эффекту патотропизма способны обеспечить активную доставку БАВ в опухолевый очаг, в то время как микрокапсулы обладают высокой загружающей способностью и могут защитить клетки носители от воздействия инкапсулируемого препарата. В данной работе микрокапсулы дополнительно были модифицированы золотыми наночастицами, что обеспечивает их чувствительность к инфракрасному излучению и позволяет контролировать высвобождение препарата из микрокапсулы. В данном исследовании в качестве модельного препарата с дозозависимым эффектом использовался винкристин.

Объекты и методы

Капсулы были синтезированы при помощи технологии Layer-by-Layer (Polyarginine/Dextran sulfate) и золь-гель синтеза (Tetraethyl orthosilicate). Была произведена оценка загружающей способности капсул микрометрового

(1-2 мкм) и субмикрометрового (500-600 нм) размеров. Также было продемонстрировано, что без воздействия инфракрасного лазера на капсулы наблюдается выход винкристина менее 10%. Благодаря этому данные капсулы являются нетоксичными для клеток носителей, что было подтверждено при проведении цитотоксикологических экспериментов. Также была выполнена оценка влияния капсул на спонтанную, а также направленную миграцию ММСК, которая показала, что при соотношении клеток и капсул 1 к 10 не наблюдается существенное снижение миграционного потенциала клеток-носителей. Оценка спонтанной миграции проводилась при помощи системы наблюдения за живыми клетками в культуре Cell-IQ, а также теста заживления раны монолоя. Влияние капсул с винкристином на направленную миграцию оценивалось при помощи слайдов для хемотаксиса. Инвазивный потенциал определялся при помощи камеры Бойдена. Для экспериментов по направленной миграции клеток использовался цитокин SDF-1, которые экспрессируется рядом опухолей, и считается ключевым в регуляции миграции ММСК.

Результаты

Также была исследована эффективность данной системы доставки на модели опухолюидов в коллагеновом геле. Опухолюид состоял из клеток меланомы, экспрессирующих SDF-1. Было продемонстрировано, что ММСК, модифицированные капсулами, были способны не только мигрировать по направлению к очагу опухоли, но также проникать в опухолюид на глубину до 50 мкм. Сравнение эффективности чистого винкристина, капсул с винкристином, а также ММСК, модифицированных капсулами с винкристином, продемон-

стрировало существенное увеличение эффективности в случае применения ММСК. Также было продемонстрировано, что воздействие инфракрасным излучением на капсулы для их вскрытия увеличивает эффект в 2-4 раза благодаря одновременному высвобождению цитостатика из капсул.

Выводы

Таким образом, была разработана система доставки лекарственных препаратов, которая была способна обеспечить высокие локальные концентрации действующего

вещества в зоне опухоли и продемонстрировала в несколько раз большую эффективность *in vitro* по сравнению со свободным препаратом.

Ключевые слова

Микро- и нанокапсулы, таргетная доставка, противоопухолевые препараты, интернализация, мезенхимные стромальные клетки, миграция, фармакокинетика, синтез, культивирование, клетки-носители.

Nivolumab combined with autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma patients

Olga V. Pirogova, Elena I. Darskaya, Valentina V. Porunova, Olga V. Kudyasheva, Elena V. Babenko, Natalia B. Mikhailova, Boris V. Afanasyev

Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

Contact: Dr. Olga V. Pirogova

E-mail: dr.pirogova@gmail.com, porunovavv@gmail.com

Introduction

Patients with multiple myeloma (MM) who do not achieve complete response (CR), or very good partial response (VGPR) after primary therapy, including autologous hematopoietic stem cell transplantation (ASCT), have short time to progression. Preclinical and clinical evidence suggests that the immune checkpoint programmed death-1 (PD-1) receptor/PD-1 ligand axis plays an important role in suppressing immune surveillance against MM, but monotherapy with anti-PD-1 antibody was not effective in patients with MM. We hypothesized that the administration of nivolumab (anti-PD-1 antibody) during the lymphodepleted state post-ASCT can improve therapeutic efficacy in MM. Our aim was to evaluate the efficacy and safety of the checkpoint inhibitor nivolumab in combination with ASCT.

Patients and methods

We conducted a phase 1-2, single-arm study of nivolumab with ASCT in MM patients who had not achieved pre-AHCT less than VGPR after induction therapy (trial NCT03292263). Nivolumab was administered 100 mg IV at the fixed dose on day -3 before and day +17 after ASCT. The primary endpoint was overall response rate (ORR). Patients aged 18-70 years with MM, of any molecular risk group and with clinical status below VGPR after induction therapy were eligible and received high-dose melphalan (140-200 mg/m² I.V.). Four patients received tandem ASCT with nivolumab.

Results

Currently, 16 patients were enrolled, including 9 males and 7 females with the median age of 55 (range, 45-62 years old). The median follow-up was 12 months (range, 7-19). Three patients (19%) had light chain MM, three patients (19%) had IgA, ten patients (62%) exhibited IgG MM. All patients received a triple-agent primary therapy, a median of 6 cycles (range, 4-9). Ten patients had partial response

(PR), two patients had stable disease (SD) and four had progressive disease (PD) prior to ASCT. Among these 16 patients, grade 4 toxicity was observed in one patient (autoimmune thrombocytopenia after engraftment); grade 3 toxicity was observed in 3 patients (1 patient with infusion reaction, 1 patient with colitis, 1 patient with neurotoxicity). There were no primary or secondary graft failure cases, and the median time to neutrophil and platelet engraftment was 12 days (range, 10-17) and 14 days (range, 9-18), respectively. At day+100 after ASCT, we evaluated response by serology and bone marrow (BM) study (morphology and flow cytometry), ORR was 56% (9/16): the CR rate was 31% (5/16), 19% (3/16) achieved VGPR, one patient (6%) achieved PR. 19% (3/16) maintained PR, 1 patient maintained SD. One of four patients with progressive disease did not achieve response. One of nine patients was relapsed. Two patients received second ASCT without nivolumab, one of them achieved CR after second ASCT. At this time all the patients are alive.

Conclusion

Preliminary results of nivolumab addition to ASCT show relative safety of the therapy. Our pilot study in patients without adequate response before ASCT demonstrate encouraging results of nivolumab combination with ASCT. The efficacy of this combination requires further investigation.

Keywords

Autologous hematopoietic stem cell transplantation, nivolumab, multiple myeloma.