

Горячева Н.А.^{1,2}, Ржевский Д.И.¹, Слащева Г.А.¹, Новикова Н.И.¹, Киселевский М.В.³, Чикилева И.О.³, Власенко Р.Я.³, Дьяченко И.А.^{1,2}, Мурашев А.Н.^{1,2}, Бондаренко Д.А.¹

Доклинические исследования острой токсичности CAR-клеточных продуктов для терапии злокачественных новообразований на примере «анти-HER2-CAR-T/CAR-NK»

¹ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, 142290, г. Пущино, Московская область, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт», 142290, г. Пущино, Московская область, Российская Федерация;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 115478, г. Москва, Российская Федерация

Введение. Car-T-клеточная терапия является современным перспективным методом в лечении онкологических заболеваний. На сегодняшний день Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США одобрено шесть препаратов для клеточной иммунотерапии онкологических заболеваний крови. Однако отсутствует информация о доклинических испытаниях данных биомедицинских клеточных продуктов, так как используемые в них T-клетки, несущие химерный антигенный рецептор, являются аутологичными для человека, что представляет проблему для применения к ним классических токсикологических тестов. Кроме того, это ставит под сомнение безопасность данных лекарственных средств, поэтому разрабатываются различные стратегии доклинических исследований, которые позволили бы преодолеть вышеуказанные проблемы и создать адекватные тест-системы с терапевтической мишенью.

Цель исследования – оценка острой токсичности противоопухолевого препарата на основе генетически модифицированных T/NK-клеток, экспрессирующих химерный T-клеточный рецептор против антигена HER2, на иммунодефицитных мышах линии BALB/c Nude.

Материал и методы. Опытная и контрольная группы включали 5 самцов и 5 самок. Тестируемый препарат, а также носитель (растворитель-криоконсервант) животным вводили однократно внутривенно или внутрибрюшинно, в объеме 0,2 мл/животное. Опытным животным исследуемый препарат вводили в двух дозах: $0,5 \cdot 10^6$ клеток/животное, эквивалентной терапевтической дозе для человека, и $5 \cdot 10^6$ клеток/животное, в 10 раз превышающей терапевтическую дозу. В ходе исследования у животных регистрировали вес тела, потребление корма и проявление клинических признаков токсичности исследуемого препарата. На 15-й день исследования животные были подвергнуты эвтаназии и некропсии с осмотром макроповреждений органов, их взвешиванием и фиксацией. С целью выявления токсического действия тестируемого биомедицинского клеточного продукта проводили гистологический анализ.

Результаты. Установлено, что однократное внутривенное или внутрибрюшинное введение биомедицинского продукта «анти-HER2-CAR-T/CAR-NK» в дозе, эквивалентной терапевтической для человека, а также в 10 раз превышающей терапевтическую, является безопасным для мышей BALB/c Nude. Проведённое доклиническое исследование продемонстрировало отсутствие значимых токсических эффектов.

Ограничения исследования. Исследование выполнено на иммунодефицитных мышах линии BALB/c Nude, поскольку исследуемый продукт содержал живые чужеродные клетки.

Заключение. Данная работа может стать основой для создания протокола по доклиническим испытаниям биомедицинских клеточных продуктов, полученных с помощью CAR- технологий.

Ключевые слова: химерный рецептор антигена; CAR; CAR-T; CAR-NK; иммунология; исследования токсичности

Соблюдение этических стандартов. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с Протоколом-заявкой на животных, рассмотренным и одобренным «Институтской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных» ФИБХ РАН.

Для цитирования: Горячева Н.А., Ржевский Д.И., Слащева Г.А., Новикова Н.И., Киселевский М.В., Чикилева И.О., Власенко Р.Я., Дьяченко И.А., Мурашев А.Н., Бондаренко Д.А. Доклинические исследования острой токсичности CAR-клеточных продуктов для терапии злокачественных новообразований на примере «анти-HER2-CAR-T/CAR-NK». *Токсикологический вестник*. 2022; 30(6): 377-385. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2022-30-6-377-385>

Для корреспонденции: Горячева Наталья Александровна, младший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, аспирант ФГБОУ ВО Пушинского государственного естественно-научного института, 142290, г. Пушкино, Московская область, Российская Федерация. E-mail: natasha.goryacheva2017@yandex.ru

Участие авторов: Горячева Н.А., Бондаренко Д.А., Ржевский Д.И., Слащева Г.А., Новикова Н.И., Дьяченко И.А., Мурашев А.Н. – сбор и обработка материала, сбор данных литературы, написание текста; Ржевский Д.И. – обработка материала и статистический анализ; Киселевский М.В., Чикилева И.О., Власенко Р.Я. – концепция и дизайн исследования. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила в редакцию: 08 февраля 2022 / Принята в печать: 12 декабря 2022 / Опубликовано: 30 декабря 2022

Goryacheva N.A.^{1,2}, Rzhevskiy D.I.¹, Slashheva G.A.¹, Novikova N.I.¹, Kisilevskiy M.V.³, Chikileva I.O.³, Vlasenko R.Ya.³, Dyachenko I.A.^{1,2}, Murashev A.N.^{1,2}, Bondarenko D.A.¹

Preclinical acute toxicity studies of the CAR technology products for malignant neoplasms therapy on the example of the «anti-HER2-CAR-T/CAR-NK»

¹Branch of the Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation;

²Pushchino State Institute of Natural Sciences, 142290, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation;

³N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 115478, Moscow, Russian Federation

Introduction. The Car-T-cell therapy is current and modern promising method for the oncology treatment. USA Food and Drug Sanitary Control Department confirms six drugs for cellular immunotherapy the blood oncology today. But the information about biomedical product preclinical test is absent, because used T-cells (cell with chimeric antigen receptor) are autologous for humans, which is the problem for use classic toxicity tests. Besides the biomedical product safety becomes questionable, therefore the different preclinical research strategy is developed to solve those problems and produce normal test-systems with therapeutic target.

The aim of the study was to evaluate the acute toxicity in immunodeficient BALB/c Nude mice of an antineoplastic drug based on genetically modified T/NK cells that express a chimeric T-cell anti-HER2 receptor.

Material and methods. Test and control groups consisted of five males and five females. Animals were injected a single intravenous or intraperitoneal injection of the testing product and the solvent-cryopreserving carrier at the dose 0,2 ml/animal. There were two doses: equal to the human therapeutic $0,5 \cdot 10^6$ cell/animal dose and ten times over then the therapeutic dose $5 \cdot 10^6$ cell/animal. During the test the animal's weight, the food intake and clinically symptoms of the testing product toxicity were registered. On the fifteenth of the study day animals were euthanatized and exposed to a necropsy with the organs' macroscopic inspection, the weighting and fixating. The detection of the testing biomedical product toxicity was the aim of the histology analysis.

Results. A single intravenous or intraperitoneal injection of the biomedical product «anti-HER2-CAR-T/CAR-NK» at the human therapeutic dose, as well as in 10 times more than the same, is safe for BALB/c Nude mice. The preclinical study has shown the absence of significant toxic effects.

Limitations. The research was performed on Balb/c nude line immunodeficient mice, because the tested product contained living foreign cells.

Conclusion. This work can be the main basis for the creation of biomedical product preclinical research protocol of biomedical cell products produced from CAR-technology.

Keywords: *chimeric antigen receptor; CAR; CAR-T; CAR-NK; immunology; toxicity studies*

Compliance with ethical standards. All manipulations with animals were carried out in accordance with the Animal Application Protocol, which was examined and approved of IACUC of the Branch of the IBCh RAS.

For citation: Goryacheva N.A., Rzhavskiy D.I., Slashheva G.A., Novikova N.I., Kisilevskiy M.V., Chikileva I.O., Vlasenko R.Ya., Dyachenko I.A., Murashev A.N., Bondarenko D.A. Preclinical acute toxicity studies of the CAR technology products for malignant neoplasms therapy on the example of the «anti-HER2-CAR-T/CAR-NK». *Toksikologicheskiy vestnik (Toxicological Review)*. 2022; 30(6): 377-385. <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2022-30-6-377-385> (in Russian)

For correspondence: *Natalya A. Goryacheva*, junior researcher of Biological Testing Laboratory, Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, PhD student of Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Russian Federation. E-mail: natasha.goryacheva2017@yandex.ru

Information about authors:

Goryacheva N.A., <https://orcid.org/0000-0003-4004-5214>
Slashheva G.A., <https://orcid.org/0000-0002-4422-487X>
Kisilevskiy M.V., <https://orcid.org/0000-0002-0132-167X>
Vlasenko R.Ya., <https://orcid.org/0000-0002-3560-001X>
Murashev A.N., <https://orcid.org/0000-0002-2279-9285>

Rzhavskiy D.I., <https://orcid.org/0000-0003-0520-4021>
Novikova N.I., <https://orcid.org/0000-0002-9145-2736>
Chikileva I.O., <https://orcid.org/0000-0003-0769-1695>
Dyachenko I.A., <https://orcid.org/0000-0002-3053-2804>
Bondarenko D.A., <https://orcid.org/0000-0002-8055-0066>

Author contribution: *Goryacheva N.A., Bondarenko D.A., Rzhavskiy D.I., Slashheva G.A., Novikova N.I., Dyachenko I.A., Murashev A.N.* – collection and processing of material, literature review, writing the text; *Rzhavskiy D.I.* – collection and processing of material, statistical analysis; *Kisilevskiy M.V., Chikileva I.O., Vlasenko R.Ya.* – the concept and design of the study. *All authors* are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Funding. The study had no sponsorship.

Received: February 08, 2022 / Accepted: December 12, 2022 / Published: December 30, 2022

Введение

Клеточная терапия рака развивается беспрецедентными темпами, особенно с появлением Т-клеток, сконструированных с помощью химерных антигенных рецепторов (CAR). Данная стратегия доказала свою эффективность против злокачественных новообразований В-клеток и демонстрирует многообещающую активность для других гематологических видов рака с потенциалом для солидных опухолей [1]. Основные нежелательные явления, с которыми сталкиваются при клиническом применении CAR-T-клеточной терапии – это синдром высвобождения цитокинов (CRS) и синдром нейротоксичности, связанный с иммунными эффекторными клетками (ICANS), оба синдрома увеличивают продолжительность госпитализации пациента и стоимость терапии. Учитывая эти недостатки обычных CAR-T-клеток, наблюдается всплеск интереса к другим субпопуляциям иммунных клеток [2–4]. NK-клетки позиционируются как многообещающая альтернативная платформа для CAR-инженерии из-за их специализированной цитотоксичности в отношении опухолей [5–8]. На сегодняшний день FDA одобрено шесть препаратов для CAR-T-клеточной терапии. Однако в регистрационных досье отсутствуют достаточные сведения о доклинических исследованиях в связи с тем, что, по заявлению производителей, классические токсикологические исследования к ним неприменимы [9–15].

Российским законодательством не предусмотрена регистрация биотехнологических клеточных лекарственных продуктов, предназначенных для

терапии онкологических заболеваний без доклинических исследований, регламентируемых законодательством [16, 17]. Поскольку они являются специфичными для человека, то требуется модификация стандартных протоколов доклинических исследований токсичности. Отсутствие универсальной модели и тестов на животных для клеточных препаратов, полученных с помощью CAR-технологий, не позволяют исследовать потенциальные побочные реакции, что ставит под сомнение этичность проведения клинических испытаний.

Задачей данного исследования являлся анализ воздействия генетически модифицированных активированных Т/NK-клеток человека, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR) к эпидермальному фактору роста (HER2) на мышей с иммунным статусом, соответствующим прекондиционной подготовке химиотерапией, предусмотренной протоколом лечения до начала введения CAR-клеток. Проведённое исследование является первым этапом разработки полного досье доклинических общетоксических исследований для данного генно-инженерного продукта.

Материал и методы

Настоящая работа выполнена в соответствии с рекомендациями Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [17] и методических рекомендаций по проведению доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов [18, 19].

В качестве тестируемого препарата использовали биомедицинский клеточный продукт,

содержащий анти-HER2-CAR-T/CAR-NK клетки – *ex vivo* активированные интерлейкином-2 (Ронколейкин, Биотех, Россия) лимфоциты здоровых доноров, генетически модифицированные с помощью электропорации химерным мышинным антигенным рецептором против опухолеассоциированного антигена HER2 (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России).

Исследование выполнено на 30 самцах и 30 самках иммунодефицитных мышей линии BALB/c Nude (SPF Питомник лабораторных животных «Пушино», Россия), средней массой тела $22,3 \pm 1,3$ г. Животные содержались в стандартных условиях барьерной зоны в соответствии с «Программой по уходу и использованию животных» Лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН, имеющей аккредитацию AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) [20]. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с Протоколом-заявкой на животных, рассмотренным и одобренным «Институтской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных» ФИБХ РАН.

Каждая опытная и контрольная группа включала 5 самцов и 5 самок. Тестируемый препарат животным вводили однократно, в объёме 0,2 мл/животное в двух дозах: $0,5 \cdot 10^6$ клеток/животное (что соответствует предполагаемой терапевтической дозе на 1 кг массы тела пациента) и $5 \cdot 10^6$ клеток/животное (10-кратное увеличение терапевтической дозы). Поскольку подобные препараты обычно вводятся в виде однократной инфузии без возможности последующей коррекции доз были выбраны две дозировки – доза $0,5 \cdot 10^6$ /кг, которая, согласно литературным данным [21, 22], входит в терапевтическое окно БКМП для человека, однако в перерасчёте на массу тела мыши, животное получает ~50-кратную клеточную нагрузку и для дозы $5 \cdot 10^6$ – ~500-кратную. Одно- и 10-кратная терапевтическая человеческие дозы являются стандартными для исследований острой токсичности [23]. Контрольным животным вводили носитель (растворитель – криоконсервант) в объёме 0,2 мл/животное. Использовали два способа введения препарата – внутрибрюшинный и внутривенный. В ходе исследования у животных регистрировали массу тела, потребление корма и проявление клинических признаков токсичности исследуемого препарата. На 15-й день исследования животные были подвергнуты эвтаназии и некропсии с осмотром макроповреждений органов, их взвешиванием и фиксацией. С целью выявления токсического действия тес-

тируемого биомедицинского клеточного продукта проводили гистологический анализ. Для всех количественных данных была применена описательная статистика: подсчитаны среднее значение и стандартное отклонение. Для установления межгрупповых различий изучаемых параметров применяли непараметрический критерий Краскела–Уоллиса с последующим применением критерия множественного сравнения рангов. Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 7.1. Различия определяли при 5% уровне значимости ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

При рутинном ежедневном осмотре животных в клетках содержания гибели животных, тяжелого состояния и выраженных токсических клинических признаков не наблюдалось. В процессе введения препаратов, а также на всем протяжении исследования не было отмечено клинических признаков отклонения в состоянии здоровья животных. Введение тестируемого препарата не вызвало отклонений в приросте массы тела животных при обоих способах введения. Статистически значимых межгрупповых различий показателей массы тела и ее прироста ни у самцов, ни у самок, выявлено не было. Кроме того, исследуемый продукт не вызвал изменений в потреблении корма животными. Однако исключение составили группы самцов и самок, получавших препарат внутривенно и внутрибрюшинно, соответственно, в высокой дозе. Их показатели, по данному параметру, были увеличены относительно контроля.

В ходе некропсии у самок, получавших тестируемый препарат в высокой дозе, было обнаружено визуальное увеличение размеров паховых лимфоузлов, а у самца из группы, получавшей тестируемый препарат внутрибрюшинно в низкой дозе, отмечено уменьшение размеров одного из семенников. При внутривенном введении в группе самок, получавших тестируемый препарат в максимальной дозе, было зарегистрировано статистически значимое уменьшение абсолютной и относительной массы надпочечников по сравнению с контрольными значениями ($p < 0,05$; рис. 1, а, б).

Статистически незначимое увеличение размеров селезенки было отмечено у самок, получавших препарат внутрибрюшинно в низкой дозе, а также у самки из контрольной группы. При внутрибрюшинном введении тестируемого препарата статистически значимых межгрупповых различий показателей абсолютной и относительной массы органов выявлено не было.

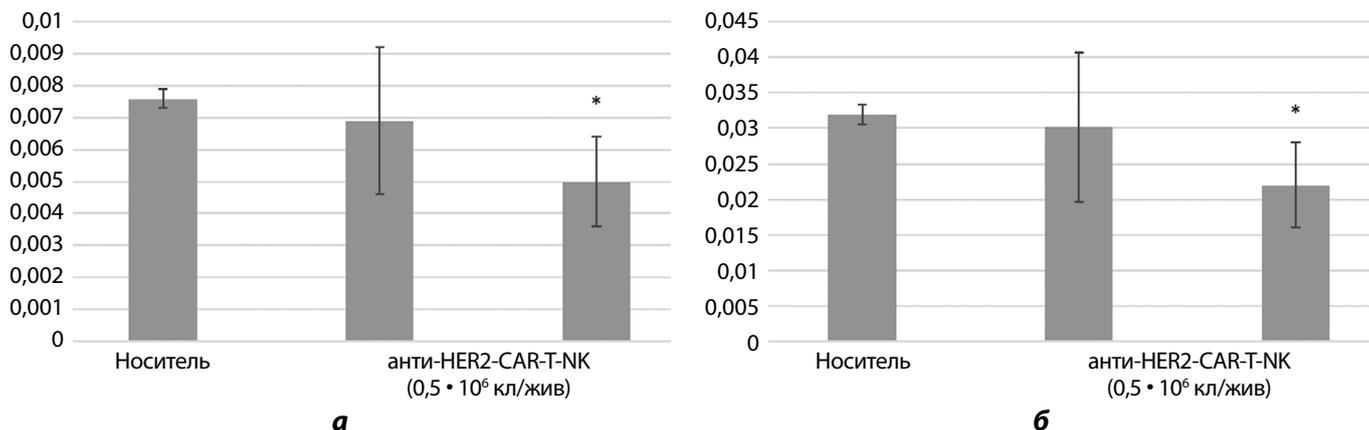


Рис. 1. Абсолютная (а) и относительная (массы тела) (б) масса надпочечников самок, получавших внутривенное введение.
* $p < 0,05$ относительно группы, получавшей носитель, на основании Краскела–Уоллиса ANOVA.

Fig. 1. Absolute (a) and relative (body weight) (b) weight of the adrenal glands of females treated intravenously.
* $p < 0.05$ relative to vehicle group based on Kruskal–Wallis ANOVA.

При макроскопическом обследовании нижнечелюстных лимфоузлов у одной самки в группе большей дозы тестируемого препарата после внутривенного введения и у ряда самок после внутрибрюшинного введения, как в контрольной группе, так и в группе большей дозы, отмечено увеличение нижнечелюстных лимфоузлов. При микроскопическом обследовании нижнечелюстных лимфоузлов у перечисленных животных было выявлено отсутствие Т-зависимой паракортикальной области. У большинства самок в группах после внутрибрюшинного введения как в контрольной, так и в группе большей дозы прочих отклонений со стороны нижнечелюстных лимфоузлов выявлено не было. У остальных самок со стороны нижнечелюстных лимфоузлов были выявлены отклонения, такие, как умеренная гиперплазия плазматических клеток в мозговых тяжах в мозговом веществе и слабовыраженная гиперплазия макрофагов в мозговом веществе.

Гистологический анализ выявил незначительные отклонения, а именно в почках был обнаружен мелкоочаговый периваскулярный инфильтрат плазматических клеток во внутренней области наружного мозгового вещества, а также были выявлены признаки слабовыраженной хронической прогрессирующей нефропатии. В селезенке у всех мышей, как в контрольных группах, так и в группах большей дозы тестируемого препарата после внутривенного и внутрибрюшинного введения отмечено небольшое количество герминативных центров в лимфоидных узелках, а также выраженное разряжение области периартериальных лимфатических влагалищ (PALS). У единичных самок, как в контрольной группе, так и в группе большей дозы тестируемого препарата

наблюдалась заметная гиперплазия плазматических клеток в лимфоидных узелках (рис. 2). Кроме того, у животных контрольных групп, а также в группах с большей дозой тестируемого препарата после внутривенного и внутрибрюшинного введения наблюдался усиленный экстрамедуллярный гемопоэз, приблизительно одинаково выраженный по проявлению признака в пределах каждой из групп.

В ходе гистологического анализа в надпочечниках выявлена липогенная кортикальная дегенерация эндокриноцитов в виде кластеров эпителиоидных клеток, заполненных липогенным пигментом и пикнотическими ядрами и заметное полнокровие синусоидных капилляров в сетчатой зоне, а также у большинства самок после внутривенного и внутрибрюшинного введения, как в контрольных группах, так и в группах большей дозы тестируемого препарата наблюдалась жировая дегенерация Х-зоны. В контрольных группах после внутривенного и внутрибрюшинного введения и в группе большей дозы тестируемого препарата после внутривенного введения отмечена слабовыраженная вакуолизация цитоплазмы эндокриноцитов в пучковой зоне (рис. 3).

Полученные в работе данные свидетельствуют о безопасности тестируемого препарата, поскольку не было обнаружено отклонений в показателях массы тела и её прироста, а также клиническом статусе животных. Выявленное отклонение в потреблении корма животными, не следует рассматривать как проявление токсического эффекта исследуемого препарата, поскольку оно было направлено в сторону увеличения.

Увеличение паховых лимфатических узлов, выявленное при макроскопическом анализе,

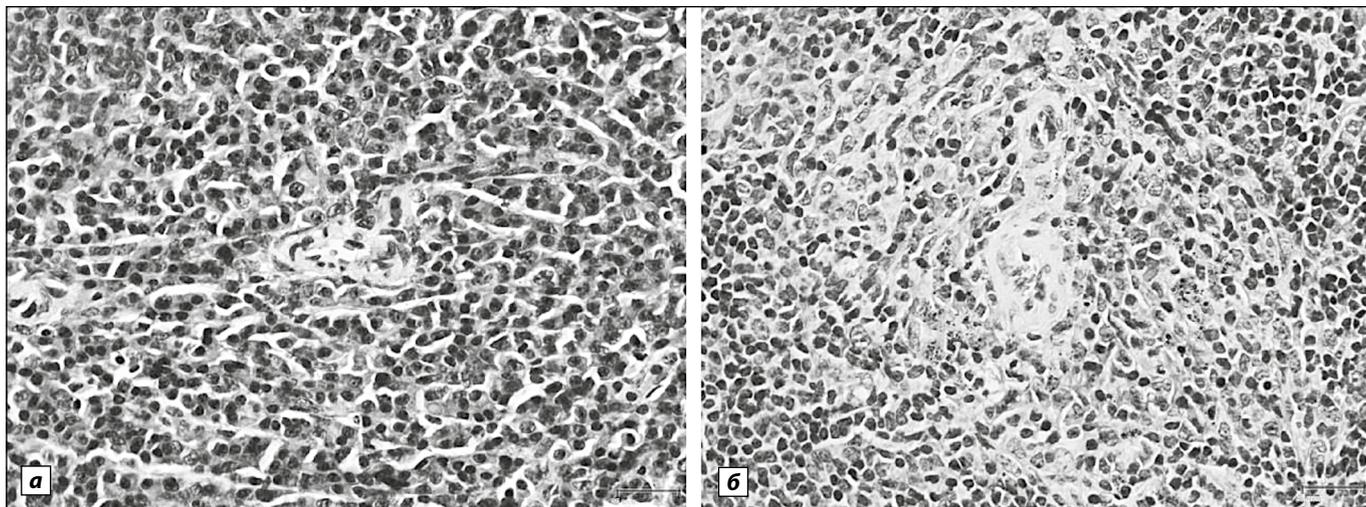


Рис. 2. Селезёнка: *a* – опытная группа; *б* – контрольная группа. Гиперплазия плазматических клеток. Увеличение 10×40. Окраска гематоксилин-эозином.

Fig. 2. Spleen: *a* – experimental group; *б* – control group. Hyperplasia of plasma cells. Magnification 10×40. Hematoxylin-eosin staining.

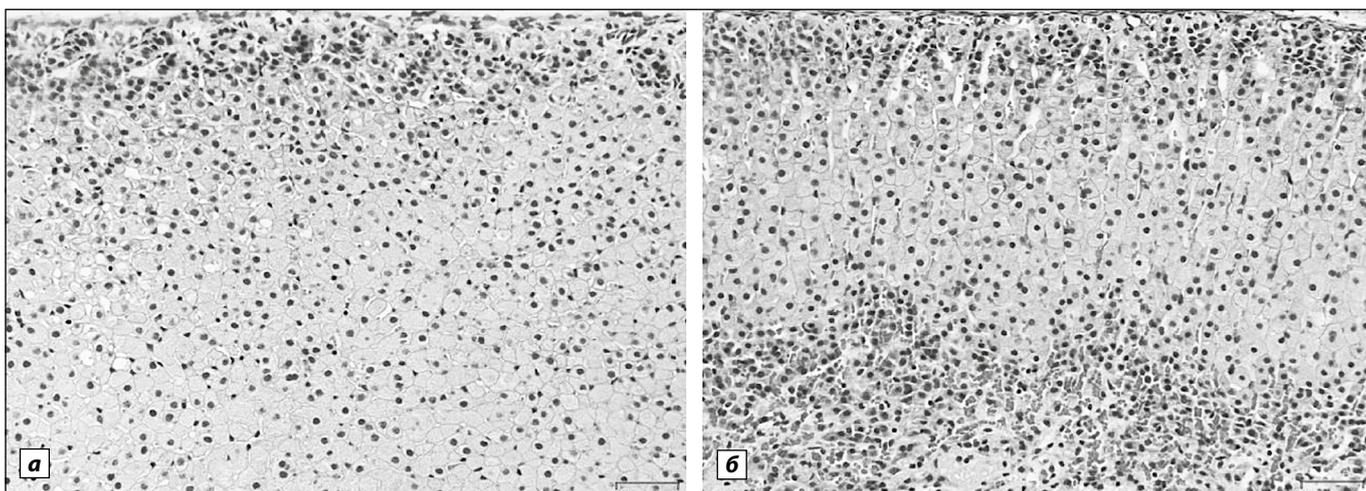


Рис. 3. Надпочечники: *a* – вакуолизация в пучковой зоне; *б* – без изменений. Увеличение 10×20. Окраска гематоксилин-эозином.

Fig. 3. Adrenals: *a* – vacuolization in the beam zone; *б* – no change. Magnification 10×20. Hematoxylin-eosin staining.

может быть связано с иммунным ответом организма экспериментальных животных на введение чужеродных клеток. Случай уменьшения размеров семенников был единичный, не имел дозозависимости, поэтому данное отклонение, скорее всего, не связано с введением тестируемого препарата. Микроскопическое обследование семенников у данного самца отклонений от нормы не выявило. Принимая во внимание, что увеличение селезёнки наблюдалось и в контрольной группе, а уменьшение размеров надпочечников не носило строгой дозовой зависимости, эти изменения не могут однозначно рассматриваться в качестве токсических проявлений, связанных с действием тестируемого препарата.

Отсутствие Т-зависимой паракортикальной области характерно для данной линии иммунодефицитных мышей BALB/c Nude и является видоспецифической нормой. Перечисленные отклонения в нижнечелюстных лимфоузлах вероятнее всего вызваны невыраженной аллергической реакцией на введение как контрольного вещества, так и тестируемого препарата в большей дозе. Учитывая, что данные отклонения со стороны нижнечелюстных лимфоузлов отмечены только у единичных самок, их не следует рассматривать существенными с точки зрения токсикологической значимости.

Обнаруженные почечные отклонения при микроскопическом исследовании не были связаны

с токсичностью препарата так как хроническая прогрессирующая нефропатия является спонтанной наиболее часто встречающейся патологией в почках у мышей. В случае, если тяжесть и частота встречаемости хронической прогрессирующей нефропатии в группах примерно одинакова, то в таком случае она не является значимой в токсикологической интерпретации результатов. Учитывая, что на фоне полнокровия в почках не наблюдалось каких-либо других серьезных дегенеративных или воспалительных признаков, а также, что полнокровие микроциркуляторного русла было невыраженным, данный морфологический признак не является токсикологически значимым. Обнаруженные плазматические клетки появляются в ответ на антигенную стимуляцию и могут указывать на развившуюся аллергическую реакцию, обусловленную индивидуальной чувствительностью животного.

Выявленные в селезенке мышей небольшие и немногочисленные группы гемопоэтических клеток наблюдаются почти всегда. В данном случае степень проявления экстрамедуллярного гемопоэза по выраженности признака отмечена выше общепринятой нормы. Однако не следует исключать возможность того, что усиленный экстрамедуллярный гемопоэз является видоспецифичным признаком для данной линии экспериментальных мышей. Найденные герминативные центры в лимфоидных узелках селезенки являются признаком антигенной стимуляции, что вероятно проявилось у мышей с индивидуально повышенной чувствительностью на введение контрольного и тестируемого вещества. Гиперплазия плазматических клеток в селезенке также свидетельствует об антигенной стимуляции.

Анализируя приведенные данные по гистологическому исследованию надпочечников, можно предполагать, что при введении Т/НК-клеток произошло повреждение коры надпочечников, проявившееся в жировой дегенерации и последующим компенсаторным регенеративным процессом в виде субкапсулярной клеточной гиперплазии эндокриноцитов и дополнительных адренортикальных узелков.

Перечисленные выше морфологические изменения пучковой зоны коры надпочечников, вырабатывающей глюкокортикоиды, влияющие на иммунитет, а также снижающие интенсивность воспалительных, аллергических реакций в организме, могут быть связаны с дисфункцией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Этим же можно объяснить увеличение потребления корма без прироста массы тела. Герминативные центры в лимфоидных узелках и гиперплазия

плазматических клеток селезенки у отдельных особей с предположительно пониженным иммунным статусом являются вероятным свидетельством антигенной стимуляции тестируемым БМКП. Также выявленным в ходе гистологического анализа отклонением, имеющим вероятную связь с введением тестируемого препарата, была признана слабовыраженная вакуолизация цитоплазмы эндокриноцитов в пучковой зоне надпочечников в группе самок, получавших тестируемый препарат внутривенно в максимальной дозе.

Заключение и выводы

Исследуемое лекарственное средство на основе биомедицинского клеточного продукта, содержащего анти-HER2-CAR-T/CAR-NK-клетки, при его однократном внутривенном и внутрибрюшинном введении самцам и самкам иммунодефицитных мышей в предполагаемой терапевтической дозе на 1 кг веса пациента, а также дозировке, в 10 раз превышающей терапевтическую, показал себя в целом безопасным. Проведенное доклиническое исследование продемонстрировало отсутствие значимых токсических эффектов у CAR-клеточного продукта для терапии злокачественных новообразований «анти-HER2-CAR-T/ CAR-NK». Полученные сведения в дальнейшем могут послужить основой для рекомендаций по доклиническим испытаниям клеточных иммунопрепаратов, полученных с помощью CAR-технологий. По результатам можно внести следующие рекомендации для проведения исследований острой токсичности биомедицинских клеточных продуктов:

Выявленные морфологические изменения надпочечников могут свидетельствовать о том, что эндокринные органы являются органами-мишенями CAR-клеток. В связи с риском развития эндокринопатий целесообразно при последующих исследованиях проводить анализ гормонов гипофиза – соматотропина, адреноректорикотропного гормона (АКТГ), тиреотропного гормона (ТТГ), гонадотропинов, пролактина, а также гормонов щитовидной и поджелудочной желез, надпочечников. В обязательном порядке, помимо надпочечников, включить в коллекцию органов гипофиз, щитовидную и поджелудочную железы.

Из нежелательных побочных явлений данной технологии наиболее вероятны аллергические реакции. Для контроля вероятности их возникновения следует мониторировать уровень иммуноглобулина Е.

Для углубленной оценки нейротоксичности целесообразно добавить расширенную батарею функциональных тестов (локомоторная актив-

ность, тест Grip Strength и т.д.) и исследование функции головного мозга электроэнцефалографией, а также периферической нервной системы электромиографией конечностей.

Предположение о вариативности иммунного статуса животных, выявленного в ходе исследования, подразумевает необходимость его скрининга до начала проведения эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

(пп. 1, 2, 4–15, 20–23 см. в References)

3. Киселевский М.В., Чикилева И.О., Ситдикова С.М., Власенко Р.Я., Караулов А.В. Перспективы применения генетически модифицированных лимфоцитов с химерным T-клеточным рецептором (CAR-T-клеток) для терапии солидных опухолей. *Иммунология*. 2019; 40(4): 48–55. <https://doi.org/10.24411/0206-4952-2019-14006>
16. ГОСТ Р 57147-2016. Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические исследования противоопухолевых лекарственных средств. М.: Стандартинформ, 2016.
17. Доклинические исследования противоопухолевых лекарственных средств. 21 ноября 2016 г. Доступно: <https://search.rsl.ru/record/01008689962>
18. Бунатян Н.Д., Васильев А.Н. и др. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Часть 2. М.: Гриф и К, 2012.
19. Ефименко А.Ф., Калинина Н.И., Макаревич П.И. Методические рекомендации по проведению доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов, М.: 2017.

REFERENCES

1. Daher M., Rezvani K. Outlook for new CAR-based therapies with a focus on CAR-NK cells: what lies beyond CAR-engineered T cells in the race against cancer. *Cancer Discov*. 2021 Jan; 11(1): 45–58. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0556>
2. Morgan M.A, Buning H., Sauer M., Schambach A. Use of Cell and Genome Modification Technologies to Generate Improved “Off-the-Shelf” CAR T and CAR NK Cells. *Front Immunol*. 2020 Aug 7; 11: 1965. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01965>
3. Kiselevsky M.V., Chikileva I.O., Sitydikova S.M., Vlasenko R.Ya., Karaulov A.V. Prospectives for application of the genetically modified lymphocytes with chimeric T-cell receptor (CAR-T-cells) for the therapy of solid tumors. *Immunologiya*. 2019; 40(4): 48–55. <https://doi.org/10.24411/0206-4952-2019-14006> (in Russian)
4. Majzner R.G., Mackall C.L. Clinical lessons learned from the first leg of the CAR T cell journey. *Nat Med*. 2019; 25: 1341–55. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0564-6>
5. Tahmasebi S., Elahi R., Khosh E. et al. Programmable and multi-targeted CARs: a new breakthrough in cancer CAR-T cell therapy. *Clin Transl Oncol*. 2021; 23: 1003–19. <https://doi.org/10.1007/s12094-020-02490-9>
6. Xie G., Dong H., Liang Y., Ham J.D., Rizwan R., Chen J. CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer. *EBioMedicine*. 2020; 59: 102975. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102975>
7. Gong Y., Klein Wolterink R., Wang J., Bos G., Germeraad W. J Hematol Clinical lessons learned from the first leg of the CAR T cell journey. *Oncol*. 2021; 14(1): 73.
8. Maoz M., Devir M., Inbar M., Inbar-Daniel Z., Sherill-Rofe D., Bloch I., Meir K., Edelman D., Azzam S., Nechushtan H., Maimon O., Uziely B., Kadouri L., Sonnenblick A., Eden A., Peretz T., Zick A. Clinical implications of sub-grouping HER2 positive tumors by amplicon structure and co-amplified genes. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 18795. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55455-6>
9. KYMRIAH (tisagenlecleucel). 28 марта 2019 г. Available at: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/kymriah-tisagenlecleucel>
10. YESCARTA (axicabtagene ciloleucel). 28 мая 2019 г. Available at: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/yescarta-axicabtagene-ciloleucel>
11. TECARTUS (brexucabtagene autoleucel). 17 декабря 2021 г. Available at: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/tecartus-brexucabtagene-autoleucel>
12. CARVYKTI. 8 марта 2022 г. Available at: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/caryvkti>
13. BREYANZI (lisocabtagene maraleucel). 4 марта 2021 г. Available at: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/breyanzi-lisocabtagene-maraleucel>
14. ABECMA (idecabtagene vicleucel). 21 апреля 2021. Available at: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/abecma-idecabtagene-vicleucel>
15. Ping-PinZheng, Johan M. Kros, Jin Li Approved CAR T cell therapies: ice bucket challenges on glaring safety risks and long-term impacts. *Drug Discovery Today*. 2018; 23(6): 1175–82. Epub 2018 Mar 1. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.02.012>
16. ГОСТ Р 57147-2016. Medicinal products for medical use. Preclinical studies of antitumor drugs. Moscow: Standartinform, 2016. (in Russian)
17. Medicine for medical application. Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals. 2017. Available at: <https://search.rsl.ru/record/01008689962> (in Russian)
18. Bunyatyan N.D. Vasiliev A.N. et al. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part 2. Moscow: Grif and K, 2012. <https://search.rsl.ru/record/01008689962> (in Russian)
19. Efimenko A.F., Kalinina N.I., Makarevich P.I. Methodical recommendations for conducting preclinical studies of biomedical cell products. Moscow: Lomonosov Moscow State University, 2017. ISBN: 978-5-8493-0352-9 (in Russian)
20. Washington D.C. The Guide for Care and Use of Laboratory Animals - National Academy Press, 2011. 247 p. Available at: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>
21. Dasyam N., George P., Weinkove R. Chimeric antigen receptor T-cell therapies: Optimising the dose. *Clin Pharmacol*. 2020 Sep; 86(9): 1678–89. <https://doi.org/10.1111/bcp.14281>
22. Gong, Y., Klein Wolterink R.G.J., Wang, J. et al. Chimeric antigen receptor natural killer (CAR-NK) cell design and engineering for cancer therapy. *Hematol Oncol*. 2021; 14(73): 1–35. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01083-5>
23. Guidance for Industry M3(R2) Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals January 2010 Revision 1 ICH. July 2008. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-m-3-r2-non-clinical-safety-studies-conduct-human-clinical-trials-marketing-authorization_en.pdf

ОБ АВТОРАХ

Горячева Наталья Александровна (Goryacheva Natal'ya Aleksandrovna) – младший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, аспирант ФГБОУ ВО Пушчинского государственного естественного-научного института, 142290, Пушкино, Московская область, Российская Федерация. E-mail: natasha.goryacheva2017@yandex.ru

Ржевский Дмитрий Иванович (Rzhevskij Dmitrij Ivanovic) – кандидат биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 142290, Пушкино, Российская Федерация. E-mail: rjevski@bibch.ru

Слащева Гульсара Амангалиевна (Slashcheva Gulsara Amsngalievna) – кандидат биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний, ФИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 142290, Пушкино, Российская Федерация. E-mail: slashcheva_ga@mail.ru

Новикова Надежда Ивановна (Novikova Nadezhda Ivanovna) – кандидат биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний, ФИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 142290, Пушкино, Российская Федерация. E-mail: novikova@bibsh.ru

Киселевский Михаил Валентинович (Kiselevskij Mikhail Valentinovich) – доктор мед. наук, профессор, руководитель лаборатории клеточного иммунитета ФГБНУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Российская Федерация. E-mail: kisele@inbox.ru

Чикилева Ирина Олеговна (Chikileva Irina Olegovna) – кандидат биол. наук, младший научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Российская Федерация. E-mail: irinatchikileva@mail.ru

Власенко Раймонда Яновна (Vlasenko Rajmonda Yanovna) – кандидат биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Российская Федерация. E-mail: vlasenko2002@bk.ru

Дьяченко Игорь Александрович (D'yachenko Igor Aleksandrovich) – кандидат биол. наук, заведующий лабораторией, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний, ФИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, доцент ФГБОУ ВО Пуцинского государственного естественно-научного института, 142290, Пуцино, Российская Федерация. E-mail: dyachenko@bibch.ru

Мурашев Аркадий Николаевич (Murashev Arkadij Nikolaevich) – доктор биол. наук, профессор., руководитель, ведущий научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, декан БиомедФарм-Технологического факультета ФГБОУ ВО Пуцинского государственного естественно-научного института, 142290, Пуцино, Российская Федерация. E-mail: murashev@bibch.ru

Бондаренко Дмитрий Александрович (Bondarenko Dmitrij Aleksandrovich) – кандидат биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 142290, Пуцино, Российская Федерация. E-mail: bondarenko@bibch.ru

