

© 2021 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 23.03.2021
Принята к печати 15.04.2021

10.24287/1726-1708-2021-20-2-30-38

Первый опыт применения локально изготовленных CAR-T-клеток у пациентов с рецидивным/рефрактерным острым лимфобластным лейкозом в Беларуси

О.В. Алейникова¹, А.А. Мигас¹, Е.А. Столярова¹, А.В. Пунько¹, Л.В. Мовчан¹, А.В. Клыч¹, О.А. Мишкова¹, А.В. Гиль¹, А.Н. Мелешко¹, Н.Е. Конопля²

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Республика Беларусь, Минский район, д. Боровляны

²ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», Республика Беларусь, Минский район, аг. Лесной

Контактная информация:

Ольга Витальевна Алейникова, член-корр. НАН РБ, д-р мед. наук, профессор, главный научный сотрудник Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии (Республика Беларусь)
Адрес: Республика Беларусь, 223053, Минский район, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43
E-mail: aleinikova2004@mail.ru

Результаты лечения рецидивного/рефрактерного острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) с помощью как стандартной, так и высокодозной химиотерапии являются неудовлетворительными и требуют разработки новых терапевтических опций. Применение подходов иммунотерапии открывает новые перспективы перед пациентами, у которых цитотоксическая химиотерапия оказалась неэффективной или непереносимой. Данная статья представляет собой описание опыта использования изготовленных на базе Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии CD19 CAR-T-клеток после режима лимфодеплеции флударабином и циклофосфамидом у 2 пациентов старше 18 лет с рефрактерным рецидивом ОЛЛ. Иные возможности консервативного лечения для этих пациентов были исчерпаны. Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь). Химерный рецептор 2-го поколения был сконструирован из анти-CD19 scFv-фрагмента антитела, трансмембранного домена CD28, сигнальных доменов белков 4-1BB и CD3z и трансдуцирован в Т-лимфоциты в составе лентивирусного вектора pWPXL. Клеточный продукт был получен путем сепарации и раздельного процессинга CD4- и CD8-лимфоцитов в присутствии интерлейкина-7 и интерлейкина-15. Оценивались субпопуляционный состав полученного CAR-T-клеточного продукта и экспрессия иммунных контрольных точек. Полученные результаты свидетельствуют о высокой антилейкемической активности полученных CAR-T-клеток. Выполнялся мониторинг персистенции CAR-T-клеток, определялся уровень минимальной остаточной болезни, а также спектр воспалительных цитокинов в крови. Оба пациента ответили на CAR-T-терапию снижением уровня бластных клеток. Лечение сопровождалось синдромом высвобождения цитокинов, контролируемым рекомбинантным моноклональным антителом к человеческому рецептору интерлейкина-6 – тоцилизумабом. Разработанная и воспроизведенная технология лабораторно полученных CAR-T-клеток может применяться для лечения пациентов с тяжелым рецидивным/рефрактерным В-линейным ОЛЛ в качестве терапии спасения и дать дополнительные шансы на их излечение.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, рецидив, рефрактерность, химерные антигенные рецепторы, CAR-T-клетки, синдром высвобождения цитокинов

Алейникова О.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2021; 20 (2): 30–38. DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-2-30-38

© 2021 by «D. Rogachev NMRCPOI»

Received 23.03.2021
Accepted 15.04.2021

The first experience of using locally manufactured CAR-T cells in patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia in Belarus

O.V. Aleinikova¹, A.A. Migas¹, E.A. Stolyarova¹, A.V. Punko¹, L.V. Movchan¹, A.V. Klych¹, O.A. Mishkova¹, A.V. Hill¹, A.N. Meleshko¹, N.E. Konoplya²

¹Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany, Minsk region, Republic of Belarus

²N.N. Alexandrov National Cancer Centre, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus

Correspondence:
Olga V. Aleinikova,
Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus,
dr. med. sci., Professor, Senior Researcher,
Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (Republic of Belarus)
Address: 43 Frunzenskaya St., Borovlyany 223053, Minsk region, Republic of Belarus
E-mail: aleinikova2004@mail.ru

The results of treatment of recurrent/refractory acute lymphoblastic leukemia (ALL) with both standard and high-dose chemotherapy are unsatisfactory and require the development of new therapeutic options. The use of immunotherapy approaches opens up new perspectives for patients whose cytotoxic chemotherapy was ineffective or intolerable. This article describes the experience of using CD19 CAR-T cells manufactured at the Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology after lymphodepletion with fludarabine and cyclophosphamide in two patients over 18 years of age with refractory relapse of ALL. Other possibilities of conservative treatment for these patients have been exhausted. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology (Republic of Belarus). The chimeric 2nd generation receptor was constructed from the anti-CD19 scFv antibody fragment, the CD28 transmembrane domain, signaling domains of the 4-1BB and CD3z proteins, and transduced into T-lymphocytes as part of the pWPXL lentiviral vector. The cell product was obtained by separation and separate processing of CD4 and CD8 lymphocytes in the presence of IL-7 and IL-15. The subpopulation composition of the resulting CAR-T

cell product and the expression of immune checkpoints were assessed. The results obtained indicate a high antileukemic activity of the obtained CAR-T cells. Monitoring of CAR-T cells' persistence, the level of minimal residual disease, and the spectrum of inflammatory cytokines in the blood was performed. Both patients responded to CAR-T therapy by lowering their blast cell levels. Treatment was accompanied by a cytokine release syndrome controlled by a recombinant monoclonal antibody to the human IL-6 receptor, tocilizumab. The developed and replicated laboratory-derived CAR-T cell technology can be used to treat patients with severe relapsed/refractory B-line ALL as rescue therapy and provide additional chances for their cure.

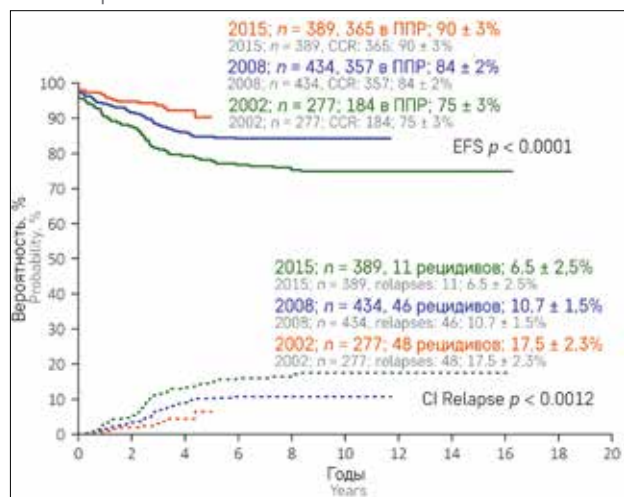
Key words: acute lymphoblastic leukemia, relapse, refractoriness, chimeric antigen receptors, CAR-T cells, cytokine release syndrome

Aleinikova O.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2021; 20 (2): 30–38.
DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-2-30-38

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) в настоящее время является курабельным заболеванием у детей более чем в 90% случаев (рисунок 1).

Рисунок 1
Оптимизация терапии детей на протоколе MB в Республике Беларусь

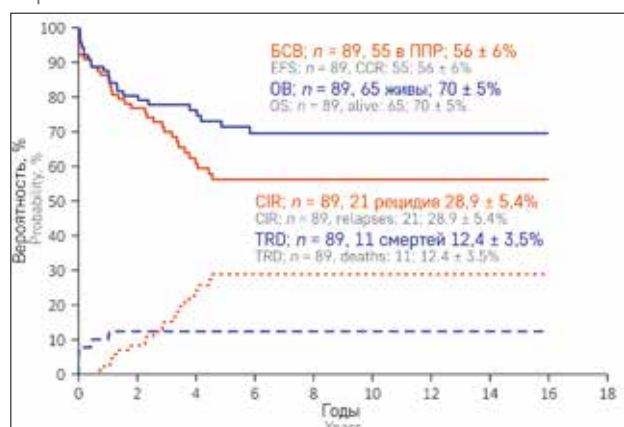
Figure 1
Therapy optimization for children on MB protocols in the Republic of Belarus



Выживаемость у подростков и молодых взрослых несколько хуже и составляет, по данным Белорусского детского канцер-субрегистра, $6 \pm 6\%$ для бессобытийной выживаемости (БСВ) и $70 \pm 5\%$ для общей выживаемости (ОВ) (рисунок 2).

Рисунок 2
Результаты выживаемости у подростков и молодых взрослых в Республике Беларусь

Figure 2
Survival outcomes in adolescents and young adults in the Republic of Belarus



Успех в лечении был достигнут путем оптимизации химиотерапии (ХТ) в первой линии на последовательных протоколах MB и улучшения сопроводительной терапии, однако у 10–15% пациентов в возрасте от 1 до 18 лет и 30–40% пациентов в возрасте от 19 до 30 лет развивается рецидив заболевания, а исходы после рецидивов ОЛЛ остаются неудовлетворительными. С помощью интенсивной комбинированной ХТ и последующей аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток можно добиться излечения от 30 до 50% всех детей с рецидивом ОЛЛ.

В последнее десятилетие появление иммунотерапии меняет терапевтические парадигмы для пациентов, у которых цитотоксическая ХТ оказалась неэффективной или непереносимой. Биспецифические активаторы Т-клеток (BiTE) – блинатумомаб или Т-клетки, экспрессирующие химерные антигенные рецепторы (CAR) могут успешно задействовать цитотоксический потенциал (аутологических или аллогенных) Т-лимфоцитов против бластных клеток пациента с острым лейкозом. Несмотря на различия в дизайне CAR, в этих испытаниях наблюдаются сходные показатели ремиссии и профили токсичности. Токсичность возникает в основном в результате гиперактивации иммунной системы, что приводит к синдрому высвобождения цитокинов (СВЦ). Тяжелый СВЦ ассоциирован с дозой CAR-T-клеток и с продвинутой стадией заболевания [1–3]. На стойкость CAR-T-клеток влияет дизайн CAR.

В данной статье мы сообщаем о нашем опыте использования локально изготовленных CD19 CAR-T-клеток после режима лимфодеплеции флударабином и циклофосфамидом у 2 молодых людей с рефрактерным рецидивом ОЛЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Республика Беларусь).

Селекция и экспансия Т-клеток

В качестве исходного материала для получения первичной культуры Т-клеток использовали

продукт афереза реципиента. Изоляцию популяций CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток проводили отдельно методом иммуномагнитной селекции с использованием соответствующих наборов CD4/CD8 Positive Isolation Kit (Thermo Fisher scientific, Норвегия). Т-клетки инкубировали в полной среде RPMI 1640 (Thermo Fisher scientific, Бразилия) с добавлением рекомбинантных цитокинов интерлейкина (ИЛ)-7 и ИЛ-15 (Miltenyi Biotec GmbH, Германия) в конечной концентрации 10 нг/мл. Активацию Т-клеток осуществляли с использованием иммуномагнитных частиц Dynabeads Human T-activator CD3/CD28 (Thermo Fisher scientific, Норвегия). Продолжительность экспансии клеточного продукта составила 13 сут, смену среды производили по достижении плотности 2×10^6 клеток/мл.

Генетическая модификация Т-клеток

Рекомбинантные псевдотипированные лентивирусные частицы, предназначенные для трансдукции Т-клеток, получали путем транзитной котрансфекции клеточной линии 293T (ATCC CRL-3216) лентивирусной системой второго поколения. Трансфер-вектор S4, полученный на основе плазмиды pWPXL (Addgene #12257), содержал бицистронную экспрессионную кассету, кодирующую последовательность CAR 2-го поколения к белку CD19 человека, а также транскрибированного варианта белка EGFR человека (рисунок 3).

В качестве пакующего вектора использовали плазмиду pCMV-dR8.91. Белок оболочки VSV-G кодировался вектором pMD2.G (Addgene #12259). Функциональный титр вирусных частиц определяли методом трансдукции клеток линии 293T серией последовательных разведений. В контроль безопасности вирусного супернатанта входило определение рекомбинантно-компетентных вирусных частиц (RCL) методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР), микробиологический контроль. Трансдукцию Т-клеток реципиента проводили в присутствии рекомбинантного фибронектина RetroNectin (Takara Bio, США). Множественность инфекции составила 5 TU/клетку.

Имунофенотипический анализ клеточного продукта

Оценку субпопуляционного состава Т-клеток осуществляли методом проточной цитометрии с

использованием антител к антигенам TIM-3, TIGIT, LAG-3, PD1, CD3, CD4, CD8, CD45, CD45RO, CCR7, CD62L, CD95 (Miltenyi Biotec GmbH, Германия). Определение функционального титра рекомбинантных лентивирусных частиц, а также уровня трансдукции Т-клеток проводили с использованием антител FAB9577R (R&D systems, США) к транскрибированному варианту белка EGFR человека.

Оценка экспансии и персистенции CAR-Т-клеток в организме реципиента

Анализ проводили на материале костного мозга и периферической крови методами проточной цитометрии (определение Т-клеток с эктопической экспрессией рекомбинантного белка EGFRt), а также количественной ПЦР с олигонуклеотидами, комплементарными последовательностям CAR.

Оценка уровня минимальной остаточной болезни

Оценку уровня минимальной остаточной болезни (МОБ) проводили методом проточной цитометрии в соответствии с описанным ранее протоколом [4], а также путем количественного определения уровня экспрессии химерного онкогена *BCR/ABL1* [5] и реаранжировок *Ig/TCR* [4].

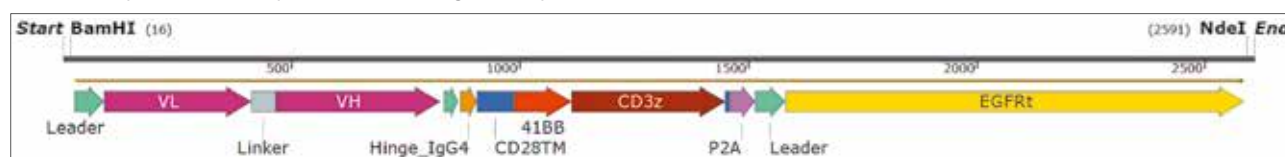
Пациенты

Пациент Б-к, 30 лет, диагноз: ОЛЛ (в костном мозге 31% бластов), L2, pre-B-иммунофенотип был установлен в июле 2019 г. В лейкоэмических клетках не было выявлено таких химерных онкогенов, как *TEL/AML*, *BCR/ABL*, *E2A/PBX1*, перестроек гена *MLL*. Согласно цитогенетическому исследованию в бластных клетках была установлена субмикроскопическая *del(12p)*, затрагивающая ген *ETV6*. Также был выявлен минорный тетраплоидный субклон лейкоэмических клеток с субмикроскопической делецией короткого плеча двух хромосом 12. Лечение заболевания проводилось по протоколу ALL MB-2015 с достижением морфологической ремиссии после окончания индукционной терапии.

Первый очень ранний изолированный костномозговой рецидив заболевания возник в августе 2020 г. (через 1 год от начала лечения на этапе консолидации 6). В рецидиве бластные клетки имели common-B-иммунофенотип, пул лейкоэмических клеток был представлен сложным кариотипом (гипо-

Рисунок 3
Генетическая карта разработанного CAR

Figure 3
Genetic map of the developed chimeric antigen receptor



плоидия в сочетании с 3 структурными aberrациями). В исследовании FISH химерный ген *TEL/AML1* не был выявлен, однако имелась делеция одной копии гена *TEL* 12p12.2 (моносомия хромосомы 12), не было перестроек генов *MLL*, *TCF3*, *IGH*, *CRLF2*, *ABL1*, *ABL2*, *NTRK3*, *PDGFRB*, *JAK2* и *ZNF384*, не выявлены инверсия *MEF2D/BCL9* и реаранжировка гена *MEF2D*, но имелась делеция второй копии генов *CRLF2*, *ABL1*, *NTRK3*, *JAK2* и *ZNF384* (моносомия хромосом Y, 9, 15 и 12). Учитывая очень ранний рецидив ОЛЛ и неблагоприятный прогноз по течению и исходу заболевания, пациенту был выполнен аферез лимфоцитов, после чего стартовала вторая линия терапии. Терапия рецидива заболевания включала 6-дневный курс профазы метилпреднизолоном, блок полихимиотерапии FLAI (флударабин, цитозар, идарубицин), однако ремиссия по основному заболеванию после проводимого лечения не была достигнута, в сентябре 2020 г. в костном мозге определялось 67,0% бластов.

В связи с тем, что все возможные методы стандартного лечения были исчерпаны, пациент имел крайне неблагоприятный прогноз по течению и исходу заболевания, единственным возможным шансом добиться ремиссии явилось проведение CAR-T-клеточной терапии.

На этапе включения в исследование по применению CAR-T-клеточной терапии у пациента отмечалось тяжелое, но компенсированное состояние, обусловленное прогрессированием основного заболевания (содержание бластов в костном мозге составило 94,5%, отмечалось увеличение печени на 5–5,5 см, селезенки – на 7–7,5 см от края реберной дуги), контролируемым инфекционным процессом (синдром системного воспалительного ответа, инфекция кровотока, вызванная *Candida guilliermondii*, *Klebsiella pneumoniae*), носительством мультирезистентной бактериальной флоры (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*). По данным компьютерной томографии органов грудной клетки отмечались единичные периваскулярные очаги уплотнения легочной ткани в S6 слева и S8 справа. По данным магнитно-резонансной томографии установлено кровоизлияние в головной мозг в хронической стадии, выявлены признаки лейкоэнцефалопатии, неокклюзионной внутренней и наружной гидроцефалии. Кроме того, у пациента была диагностирована тяжелая периферическая нейропатия III степени согласно критериям CTCAE 5.0.

После получения разрешения на проведение терапии в Министерстве здравоохранения Республики Беларусь, а также подписания пациентом информированного согласия была проведена CAR-T-клеточная терапия.

Пациент Б-ч, 30 лет, диагноз: Common-B-клеточный ОЛЛ, Ph⁺ был установлен в августе 2014 г.

Лечение заболевания проводилось по протоколу ALL MB-2008 + иматиниб. Изолированный костномозговой Ph⁺-рецидив I диагностирован в январе 2019 г., в связи с чем была проведена терапия второй линии, которая включала 8 блоков полихимиотерапии по протоколу Hyper CVAD + нилотиниб. В марте 2019 г. была достигнута ремиссия II. В дальнейшем пациент получал поддерживающую терапию нилотинибом. За период проводимой терапии пациенту был найден аллогенный HLA-совместимый неродственный донор для проведения аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, однако в сентябре 2020 г. был диагностирован очередной изолированный костномозговой Ph⁺-рецидив II ОЛЛ. Пациенту был проведен блок полихимиотерапии FLAG (флударабин, цитозар), однако ремиссия не была достигнута (на 26.10.2020 в костном мозге определялось 14,2% бластов). Поскольку и в этом случае все возможные методы консервативного лечения были исчерпаны, а пациент имел крайне неблагоприятный прогноз по основному заболеванию, единственным возможным шансом добиться ремиссии также явилось проведение CAR-T-клеточной терапии. В связи с чем пациенту был выполнен аферез лимфоцитов.

На этапе включения в исследование по применению CAR-T-клеточной терапии содержание бластов в костном мозге пациента составило 73%, отмечалось увеличение печени на 1,5 см, исследуемый не являлся носителем резистентной бактериальной флоры, кроме того, после комплексного обследования у него не было выявлено очагов инфекции. После получения разрешения на проведение терапии в Министерстве здравоохранения Республики Беларусь, а также подписания пациентом информированного согласия была проведена CAR-T-клеточная терапия.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение клеточного продукта и его функциональная характеристика

В ходе экспансии *ex vivo* Т-лимфоцитов реципиентов были получены конечные продукты в количестве, превышающем в 2 раза расчетную дозу введения. Субпопуляционный состав и содержание Т-лимфоцитов, экспрессирующих CAR, соответствовали требованиям экспериментального протокола (таблица 1).

Полученный продукт соответствовал заявленным в протоколе критериям безопасности: микробиологическая чистота, отсутствие RCL.

Экспансия и персистенция CAR⁺-Т-клеток *in vivo*

Оценку эффективности экспансии и персистенции Т-лимфоцитов, экспрессирующих CAR к

Таблица 1

Характеристика конечного клеточного продукта

Table 1

Characterization of the final cell product

Параметр Parameter	Реципиент Recipient			
	Б-ч B-ch		Б-к B-k	
	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
Общий прирост (разы) A total increase (fold)	187	180	167	44
Уровень трансдукции (% EGFRt ⁺ -клеток) The level of transduction (% of EGFRt ⁺ cells)	27	20	30	18
Субпопуляционный состав (%): Subpopulation composition (%):				
стволовые клетки памяти memory stem cells	2,1	11	5,1	27,8
центральные клетки памяти central memory cells	25,3	48	50,2	59,3
эффекторные клетки памяти effector memory cells	65,5	29,1	42,6	12,5
терминальные эффекторы terminal effectors	7,1	11,9	2	0,3
Экспрессия рецепторов иммунных контрольных точек (%): The expression of immune checkpoints receptors (%):				
TIM-3	97,4	99,9	Нет данных No data available	Нет данных No data available
TIGIT	5,8	10,1	Нет данных No data available	Нет данных No data available
LAG-3	0,5	1,1	Нет данных No data available	Нет данных No data available
PD1	1,5	0,2	Нет данных No data available	Нет данных No data available

белку CD19 человека, проводили на материале костного мозга и периферической крови реципиента на контрольных точках, обозначенных в экспериментальном протоколе.

Для пациента Б-к содержание CAR-T-клеток по данным иммунофенотипирования на 5-е сутки от начала терапии составляло 15%, на 8-е сутки – 97,6% всех Т-клеток периферической крови.

В случае пациента Б-ч согласно данным иммунофенотипирования (рисунки 4А, Б), а также количественной ПЦР (рисунок 4В) пик экспансии CAR⁺-клеток пришелся на 14–22-й дни от момента введения клеточного продукта.

Мониторинг уровня минимальной остаточной болезни

Для пациента Б-к удалось зафиксировать снижение количества CD45⁺, CD19⁺, CD20⁺-клеток в материале периферической крови с 70% на день 0 до 0,01% уже на день 5 после введения клеточного продукта, на 8-е сутки содержание целевой популяции опустилось ниже порога определения (0,01%).

У пациента Б-ч по данным иммунофенотипического анализа уровень МОБ опустился ниже порога определения (0,01%) уже на 16-е сутки от момента введения клеточного продукта как в периферической крови, так и в костном мозге (рисунок 5).

Количественное определение транскрипта химерного онкогена *BCR/ABL1* в материале костного мозга реципиента Б-ч продемонстрировало устойчивое снижение показателя МОБ (рисунок 6). К 56-му дню от начала проведения CAR-T-терапии снижение

составило более 4 логарифмов от начального значения. Анализ МОБ для пациента Б-ч выполнялся по клональным реаранжировкам *TCRG* и делеции *Vk-KDE* и показал отрицательное значение МОБ на 56-й и 70-й дни после инфузии CAR-T [6].

Оба пациента имели высокий бластоз в костном мозге на момент трансфузии CAR-T-клеток. У обоих пациентов после введения CAR-T-клеток развились токсические осложнения, характерные для данного вида терапии. Так, СВЦ развился у обоих пациентов, несмотря на профилактическое введение им тоцилизумаба в день 0 в дозе 8 мг/кг.

Пациент Б-к развил СВЦ III степени тяжести на 5-е сутки, включая гемодинамическую нестабильность, требующую болюсов внутривенной жидкости, вазопрессоров и неинвазивной искусственной вентиляции легких. После введения 2 доз тоцилизумаба 8 мг/кг с интервалом 8 ч состояние пациента несколько стабилизировалось, однако после кратковременного улучшения возникли признаки прорывной инфекции, септического шока и на 10-е сутки пациент умер. На аутопсии обнаружены тотальный геморрагический некроз легкого, признаки нарушения кровообращения и септические очаги преимущественно в виде эмболов из мицелия гриба *Mucor corymbifera*. При бактериологическом исследовании выявлены *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*. В костном мозге обнаружено небольшое количество бластов в состоянии некробиоза.

У пациента Б-ч СВЦ II степени тяжести манифестировал на 8-й день лихорадкой и падением сатурации O₂. После введения 1 дозы тоцилизумаба

Рисунок 4

Экспансия и персистенция CAR⁺-Т-клеток *in vivo* (пациент Б-ч): А, Б – данные иммунофенотипирования; В – количественная ПЦР

Figure 4

Expansion and persistence of CAR⁺-T cells *in vivo* (patient B-ch): A, B – immunophenotyping data; B – quantitative PCR results

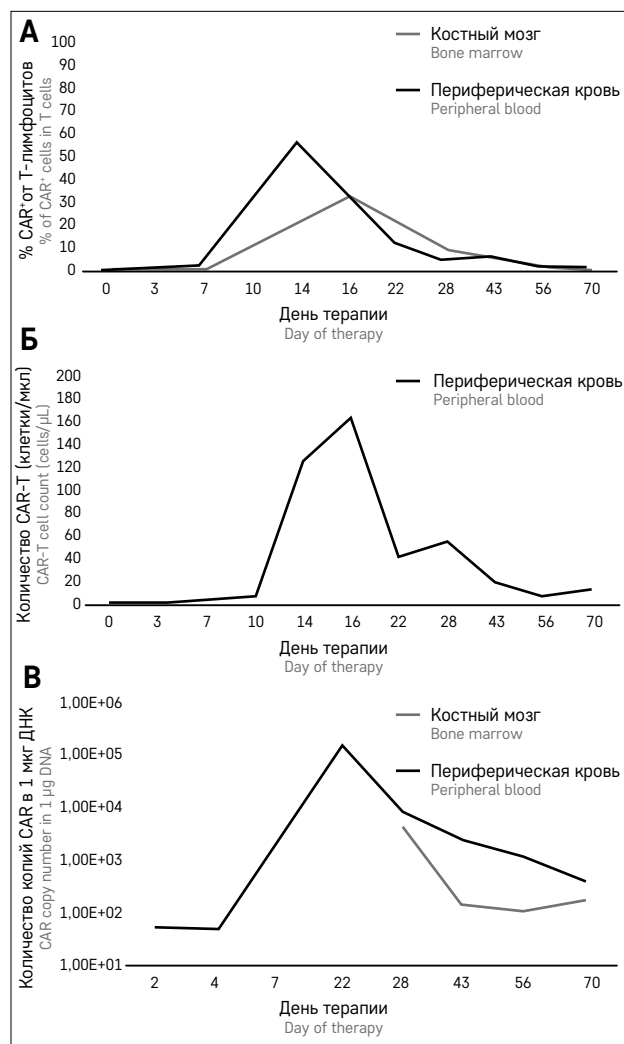


Рисунок 5

Оценка уровня МОБ методом иммунофенотипирования, пациент Б-ч

Figure 5

Minimal residual disease (MRD) assessment by immunophenotyping, patient B-ch

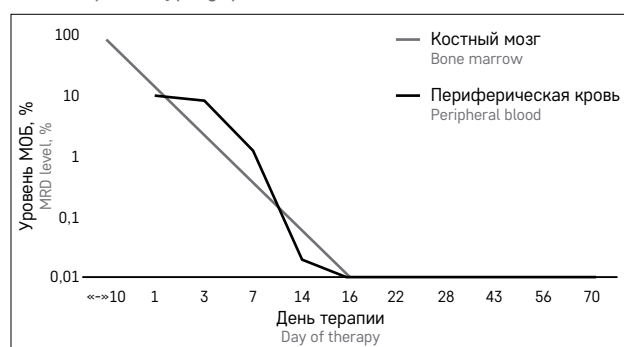
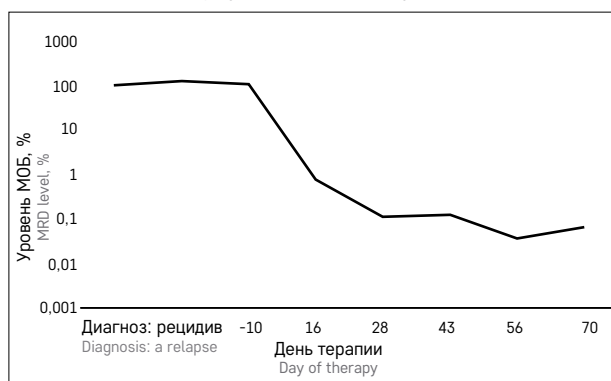


Рисунок 6

Оценка уровня МОБ методом количественной ПЦР, пациент Б-ч

Figure 6

MRD assessment by quantitative PCR, patient B-ch



состояние пациента стабилизировалось. На 10-й день от момента инфузии CAR-T-клеток у пациента развилась нейротоксичность II степени согласно критериям CTCAE 5.0, которая проявлялась делирием с нарушением ориентации во времени и пространстве, снижением когнитивных функций с расстройством сознания. Неврологические нарушения были купированы назначением дексаметазона 10 мг каждые 6 ч в течение 4 дней и леветирацетама в терапевтической дозе.

На 70-й день от момента трансфузии CAR-T-клеток пациент Б-ч находится в полной молекулярной ремиссии: *BCR/ABL* p190 – $6,6 \times 10^{-4}$, МОБ по мишеням *Ig/TCR* – отрицательно. Пациент готовится к трансплантации костного мозга от неродственного донора. Клинические характеристики пациентов приведены в таблице 2.

Проведенное нами исследование спектра цитокинов у обоих пациентов (таблица 3) показало, что, начиная со 2-го дня от момента введения CAR-T-клеток, уровень всех ежедневно исследуемых цитокинов повышался к моменту проявления клинических симптомов СВЦ, особенно ИЛ-2R и ИЛ-6. Эти показатели могут быть хорошими биомаркерами начинающегося СВЦ для своевременного его купирования рекомбинантным моноклональным антителом к человеческому рецептору ИЛ-6 – тоцилизумабом.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты лечения рецидивного/рефрактерного ОЛЛ с помощью как стандартной, так и высокодозной ХТ являются неудовлетворительными и требуют разработки новых терапевтических опций. Клеточная терапия, а именно адаптивные Т-лимфоциты, экспрессирующие CAR, становится эффективным методом лечения этих пациентов. Идея адаптивной иммунотерапии с использованием лимфоцитов возникла в начале 1990-х годов. Многие



Таблица 2
Клиническая характеристика пациентов

Table 2
Clinical characteristics of the patients

Параметр Parameter	Пациент Б-к Patient B-k	Пациент Б-ч Patient B-ch
Возраст, годы Age, years	30	30
Диагноз Diagnosis	В-клеточный ОЛЛ, рецидив I B-cell ALL, relapse I	В-клеточный ОЛЛ, Ph ⁺ , рецидив II B-cell ALL, Ph ⁺ , relapse II
Бласты костного мозга на момент проведения CAR-T, % Bone marrow blasts at the time of CAR-T, %	94,5	73
Инфекция на момент проведения CAR-T Infections at the time of CAR-T	Сепсис Sepsis	–
СВЦ: Cytokine release syndrome: начало onset длительность duration	III степень Grade III 5-е сутки Day 5 3 дня 3 days	II степень Grade II 8-е сутки Day 8 2 дня 2 days
Нейротоксичность: Neurotoxicity: начало onset длительность duration	–	II степень Grade II 10-й день Day 10 4 дня 4 days
Костный мозг на день 14 Bone marrow on Day 14	–	Миелокарициты – 3×10^9 , бласты – 0 Myelokaryocytes – 3×10^9 , blasts – 0
Костный мозг на день 28 Bone marrow on Day 28	–	Миелокарициты – $52,0 \times 10^9$, бласты – 0,75 Myelokaryocytes – $52,0 \times 10^9$, blasts – 0.75

Таблица 3
Спектр цитокинов у пациентов Б-к и Б-ч

Table 3
The spectrum of cytokines in the patients B-k and B-ch

Пациент Patient	Показатель Parameter	Нормальные значения Normal range	День Day								
			–1	2	3	5	7	9	10	11	13
Б-к B-k	ИЛ-1b, пг/мл IL-1B, pg/ml	< 5		15,8	8,58		15	–	127	–	–
	ИЛ-2R, Е/мл IL-2R, U/ml	223–710		4080	5222		> 7500	–	> 7500	–	–
	ИЛ-6, пг/мл IL-6, pg/ml	< 5,9		9995	18778		1405	–	347 000	–	–
	ИЛ-8, пг/мл IL-8, pg/ml	< 62		5730	7500		1075	–	7500	–	–
	ИЛ-10, пг/мл IL-10, pg/ml	< 9,1		15,5	15,5		23,3	–	1000	–	–
	ФНО-α, пг/мл TNF-α, pg/ml	< 8,1		44,3	68,3		20,2	–	204	–	–
Тоцилизумаб, 8 мг/кг Tocilizumab, 8 mg/kg			 								
Б-ч B-ch	ИЛ-1b, пг/мл IL-1B, pg/ml	< 5	–	< 5	< 5		< 5	7,05	14,8	< 5	< 5
	ИЛ-2R, Е/мл IL-2R, U/ml	223–710	–	813	1527		2763	5735	> 7500	6961	3410
	ИЛ-6, пг/мл IL-6, pg/ml	< 5,9	< 2	302	206		253	3373	6167	146	6,3
	ИЛ-8, пг/мл IL-8, pg/ml	< 62	< 5	35,8	25,8		32,8	191	443	113	34,2
	ИЛ-10, пг/мл IL-10, pg/ml	< 9,1	< 5	8,72	49		296	623	192	39,5	5
	ФНО-α, пг/мл TNF-α, pg/ml	< 8,1	–	13,7	18,4		20,8	47,7	44,1	13,8	6,54

Примечание. ФНО-α – фактор некроза опухоли-α.
Notes. IL – interleukin; TNF-α – tumor necrosis factor α.

ведущие североамериканские центры, такие как Мемориальный онкологический центр Слоун Кеттеринг (MSKCC), Университет Пенсильвании (UPenn), Детская больница Филадельфии (CHOP), Онкологический исследовательский центр Фреда Хатчинсона (FHCRC) и Национальный институт рака (NCI) разработали продукты CAR-T и приступили к их

клиническим испытаниям в терапии В-клеточных злокачественных новообразований. В 2012 г. UPenn был первым, где создали исследовательский альянс с фармацевтической компанией для разработки коммерческого продукта CAR-T-клеток [7].

По последним оценкам, общая стоимость продуктов CAR-T-клеточной терапии, созданных с

использованием существующих производственных подходов, составляет 150 000–475 000 долларов [3].

CAR-T-продукты могут производиться с использованием ручной обработки, которая является трудоемкой и сложно масштабируемой, однако значительно менее затратной. В основном это связано с индивидуальным характером терапии CAR-T в сочетании с отсутствием технологий мелкомасштабного производства, предназначенных для клеточной терапии, а также с необходимостью быстрого получения материала для ранней фазы испытаний. По такому пути пошли некоторые центры, имеющие соответствующие лаборатории, такие как Медицинский центр Шиба (Израиль) [8]. В Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (Республика Беларусь) 1 июня 2019 г. была открыта новая лаборатория генетических биотехнологий, которая предназначена для производства биологических продуктов (вакцины, клеточные продукты) для лечения злокачественных новообразований. Одной из главных задач явилась отработка технологической схемы мануального изготовления CAR-T-лимфоцитов на первом этапе, их полномасштабное тестирование и проведение клинического испытания. На втором этапе возможно автоматизированное производство клеточного продукта на биореакторах открытого типа.

Полученные нами результаты свидетельствуют о высокой антилейкемической активности полученных CAR-T-клеток. Так, пациент Б-ч на 70-й день от момента трансфузии CAR-T-клеток находится в полной молекулярной ремиссии: *BCR/ABL* p190 – $6,6 \times 10^{-4}$, МОБ по мишеням *Ig/TCR* – отрицательно. На аутопсии пациента Б-к в костном мозге обнаружено небольшое количество бластов в состоянии некробиоза, несмотря на то, что он умер на 10-е сутки от введения CAR-T-клеток. Высокую антилейкемическую активность CAR-T-клеток отмечают многие исследователи [9, 10] даже после неудачной терапии ОЛЛ блинатумомабом [8].

У обоих наших пациентов развился СВЦ, потребовавший введения рекомбинантного моноклонального антитела – тоцилизумаба, эффективность которого была показана купированием клинических проявлений СВЦ и нормализацией уровня цитокинов. СВЦ наблюдается у некоторых пациентов после других иммунобиологических препаратов, включая ритуксимаб, муромонаб и блинатумомаб, но он встречается почти у всех пациентов, успешно пролеченных CAR-T-клетками [4, 5, 11]. Признаки и симптомы СВЦ возникают вторично по отношению к экспансии CAR-T-клеток и активации иммунной системы, начиная от легких конституциональных симптомов лихорадки и миалгии до тяжелых угрожающих жизни

последствий, включая резистентную к жидкости гипотензию и полиорганную дисфункцию, требующую интенсивной терапии. Тяжесть СВЦ коррелирует с повышением уровня нескольких ключевых цитокинов, включая интерферон- γ , ИЛ-6, ИЛ-5, ИЛ-10 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор [1, 12].

Симптомы СВЦ могут имитировать синдром системной воспалительной реакции. Хотя большинство лихорадок, наблюдаемых у пациентов с СВЦ, связано с высвобождением провоспалительных цитокинов, а не с сепсисом, сопутствующие неконтролируемые инфекции могут усугублять СВЦ и приводить к смерти пациентов [2, 13]. В нашем случае пациент Б-ч на момент проведения терапии CAR-T-клетками имел контролируемый инфекционный процесс (синдром системной воспалительной реакции, инфекцию кровотока, вызванную *Candida guilliermondii*, *Klebsiella pneumoniae*) и являлся носителем мультирезистентной бактериальной флоры (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*), что усугубило его состояние и привело к летальному исходу на 10-е сутки после трансфузии CAR-T. На аутопсии был обнаружен недиагностированный прижизненно *Mucor*. Таким образом, терапию CAR-T-клетками следует проводить пациентам при отсутствии у них системного инфекционного процесса, а всех больных с CAR-T-клетками, у которых развивается лихорадка, следует лечить от потенциальной инфекции [11].

Нейротоксичность – еще одно распространенное осложнение, связанное с терапией CAR-T-клетками, которое возникает у некоторых пациентов даже без выявленного заболевания центральной нервной системы. Если СВЦ обычно проявляется через 1–7 дней после инфузии CAR-T, то начало проявления симптомов нейротоксичности менее предсказуемо, но обычно происходит после начала СВЦ. Симптомы сильно различаются: от легкой дезориентации, зрительных галлюцинаций до тревожных расстройств [2, 14]. У пациента Б-ч нейротоксичность II степени развилась на 10-е сутки и проявилась делирием с нарушением ориентации во времени и пространстве, снижением когнитивных функций с расстройством сознания.

Современные методы лечения нейротоксичности, вызванной CAR, направлены на ослабление воспалительной реакции. Тоцилизумаб не проникает через гематоэнцефалический барьер и не может действовать на рецепторы ИЛ-6 в центральной нервной системе. В то время как анти-ИЛ-6-терапия показана для лечения нейротоксичности у пациентов с сопутствующим тяжелым СВЦ, больных с нейротоксичностью в отсутствие тяжелого СВЦ, для пациентов с продолжающейся тяжелой нейротоксичностью после

лечения тоцилизумабом или силтуксимабом показаны высокие дозы кортикостероидов [15, 16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение мы можем констатировать, что разработанная и воспроизведенная технология лабораторно полученных CAR-T-клеток может применяться для лечения пациентов с тяжелым рецидивным/рефрактерным В-линейным ОЛЛ в качестве

терапии спасения и дать дополнительные шансы на их излечение.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Aleinikova O.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0143-1921>

Литература

- Teachey D.T., Lacey S.F., Shaw P.A., Melenhorst J.J., Maude S.L., Frey N., et al. Identification of predictive biomarkers for cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Discov* 2016; 6 (6): 664–79. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0040
- Fitzgerald J.C., Weiss S.L., Maude S.L., Barrett D.M., Lacey S.F., Melenhorst J.J., et al. Cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor T cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Crit Care Med* 2017; 45 (2): e124–31. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002053
- Walker A., Johnson R. Commercialization of cellular immunotherapies for cancer. *Biochem Soc Trans* 2016; 44: 329–32.
- Winkler U., Jensen M., Manzke O., Schulz H., Diehl V., Engert A. Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8). *Blood* 1999; 94 (7): 2217–24.
- Bugelski P.J., Achuthanandam R., Capocasale R.J., Treacy G., Bouman-Thio E. Monoclonal antibody-induced cytokine-release syndrome. *Expert Rev Clin Immunol* 2009; 5 (5): 499–521. DOI: 10.1586/eci.09.31
- Meleshko A.N., Savva N.N., Fedasenko U.U., Romancova A.S., Krasko O.V., Eckert C., et al. Prognostic value of MRD-dynamics in childhood acute lymphoblastic leukemia treated according to the MB-2002/2008 protocols. *Leuk. Res* 2011; 35 (10): 1312–20. DOI: 10.1016/j.leukres.2011.04.013
- Vairy S., Garcia J.L., Teira P., Bittencourt H. CTL019 (tisagenlecleucel): CAR-T therapy for relapsed and refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Drug Des Devel Ther* 2018; 12: 3885–98.
- Jacoby E., Bielora B., Avigdor A., Itzhaki O., Hutt D., Nussboim V., et al. Locally produced CD19 CAR T cells leading to clinical remissions in medullary and extramedullary relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol* 2018; 93 (12): 1485–92. DOI: 10.1002/ajh.25274. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30187944.
- Martino M., Alati C., Canale F.A., Musuraca G., Martinelli G., Cerchione C. A Review of Clinical Outcomes of CAR T-Cell Therapies for B-Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci* 2021; 22 (4): 2150. DOI: 10.3390/ijms22042150
- Aamir S., Anwar M.Y., Khalid F., Irfan Khan S., Ashar Ali M., Ehsan Khattak Z. Systematic Review and Meta-analysis of CD19-Specific CAR-T Cell Therapy in Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia in the Pediatric and Young Adult Population: Safety and Efficacy Outcomes. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2020; 21 (4): e334–47. DOI: 10.1016/j.clml.2020.12.010
- Teachey D.T., Rheingold S.R., Maude S.L., Zugmaier G., Barrett D.M., Seif A.E., et al. Cytokine release syndrome after blinatumomab treatment related to abnormal macrophage activation and ameliorated with cytokine-directed therapy. *Blood* 2013; 121 (26): 5154–7. DOI: 10.1182/blood-2013-02-485623
- Lee D.W., Gardner R., Porter D.L., Louis C.U., Ahmed N., Jensen M., et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* 2014; 124 (2): 188–95.
- Frey N.V., Levine B.L., Lacey S.F., Grupp S.A., Maude S.L., Schuster S.J., et al. Refractory cytokine release syndrome in recipients of chimeric antigen receptor (CAR) T cells. *Blood* 2014.
- Maude S.L., Frey N., Shaw P.A., Aplenc R., Barrett D.M., Bunin N.J., et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* 2014; 371 (16): 1507–17.
- Neelapu S.S., Tummala S., Kebriaei P., Wierda W., Gutierrez C., Locke F.L., et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy – assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; 15 (1): 47–62. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.148
- Vormittag P., Gunn R., Ghorashian S., Veraitch F.S. A guide to manufacturing CAR T cell therapies. *Curr Opin Biotechnol* 2018; 53: 164–81. DOI: 10.1016/j.copbio.2018.01.025. Epub 2018 Feb 18. PMID: 29462761.