

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ЦИКЛОФИЛИН А ЧЕЛОВЕКА В КОМБИНАЦИИ С АДОПТИВНОЙ Т-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИЕЙ УСИЛИВАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ИММУНОТЕРАПИИ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ *in vivo*

© 2023 А.А. Калинина*, Д.Б. Казанский, Л.М. Хромых

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, 115478 Москва, Россия; электронная почта: aakalinina89@gmail.com

Поступила в редакцию 15.12.2022

После доработки 08.02.2023

Принята к публикации 08.02.2023

Адоптивная Т-клеточная терапия (АКТ) успешно внедряется в лечение онкологических заболеваний. Основные ограничения эффективности АКТ обусловлены низкой жизнеспособностью, коротким временем персистенции и потерей функциональной активности Т-клеток после адоптивного переноса. Поиск новых иммуномодуляторов, способных улучшить выживаемость, экспансию и функции Т-лимфоцитов при адоптивном переносе с минимальным развитием побочных эффектов, позволит создать более успешные и безопасные стратегии АКТ. Особый интерес в этом отношении представляет рекомбинантный циклофилин А человека (рчЦФА), который обладает плеiotропным иммуномодулирующим действием, направленным на стимуляцию врожденного и адаптивного противоопухолевого иммунитета. В настоящей работе изучали влияние рчЦФА на эффективность АКТ. В исследованиях использовали ранее разработанную экспериментальную систему адоптивной терапии лимфомы EL-4 мыши, в которой источником опухолеспецифических Т-клеток для АКТ служили лимфоциты трансгенных мышей 1D1a с врожденным пулом Т-лимфоцитов, способных распознавать антигены данной опухоли. В моделях иммунокомпетентных и иммунодефицитных трансгенных мышей было показано, что 3-дневное введение рчЦФА значительно стимулировало отторжение лимфомы EL-4 и улучшало выживаемость животных-опухоленосителей после адоптивного переноса лимфоцитов трансгенных мышей 1D1a в сниженных дозах. Наши исследования показали, что рчЦФА способен значительно повышать эффективность АКТ посредством усиления эффекторных функций опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов. Полученные результаты открывают широкие перспективы для разработки новых подходов адоптивной Т-клеточной иммунотерапии злокачественных новообразований с использованием рчЦФА как альтернативы существующей цитокиновой терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: циклофилин А, адоптивная клеточная терапия, цитокиновая терапия, противоопухолевая терапия, Т-клеточный рецептор, цитотоксический Т-лимфоцит, иммунодефицит, трансгенез.

DOI: 10.31857/S0320972523050020, **EDN:** AXIUUK

ВВЕДЕНИЕ

Адоптивная клеточная терапия (АКТ) — это перспективный, активно развивающийся подход иммунотерапии онкологических заболеваний, который предполагает введение пациенту аутологичных опухолеспецифических Т-лимфоцитов [1, 2]. Их источником могут служить опухоль-инфильтрирующие лимфоциты или Т-клетки, генетически модифициро-

ванные Т-клеточными рецепторами (ТКР) или химерными антигенными рецепторами (CAR), специфичными к антигенам опухоли [1–4]. Многочисленные клинические данные подтвердили эффективность АКТ с использованием ТКР-модифицированных Т-клеток при лечении различных солидных опухолей (меланомы, синовиальной саркомы, карциномы толстой кишки и др.) и CAR-Т-клеток при терапии В-клеточных лимфом [3, 4].

Принятые сокращения: АКТ — адоптивная клеточная терапия; ТКР — Т-клеточный рецептор; ЦФА — циклофилин А; рчЦФА — рекомбинантный циклофилин А человека; ЦТЛ — цитотоксические лимфоциты; Kb — молекула главного комплекса гистосовместимости H2-K^b.

* Адресат для корреспонденции.

Основными ограничениями АКТ являются низкая жизнеспособность и короткое время персистенции Т-клеток в организме пациента после адоптивного переноса [5, 6], а также потеря их функциональной активности в супрессорном микроокружении опухоли [7, 8]. Разработка стратегий, позволяющих поддерживать эффективность адоптивно перенесенных Т-лимфоцитов, остается актуальной практической задачей развития АКТ.

В ряде клинических испытаний АКТ солидных опухолей в протоколы лечения включена курсовая терапия интерлейкином-2 (ИЛ-2) [9–11]. ИЛ-2 стал первым цитокином, высокая эффективность которого была показана при лечении онкологических заболеваний, что обусловлено его иммуномодулирующим действием, направленным на стимуляцию пролиферации, дифференцировки и активации Т-клеток и естественных киллеров (НК-клеток) [12, 13]. Между тем введение пациентам высоких доз ИЛ-2 сопряжено с развитием тяжелых токсических эффектов (анемии, цитопении, гипотонии, почечной недостаточности и др.), вплоть до летальных исходов [12, 14]. Поиск новых иммуномодуляторов, способных улучшить выживаемость, экспансию и функциональную активность Т-лимфоцитов при адоптивном переносе с минимальным развитием побочных эффектов, позволит создать более успешные и безопасные стратегии АКТ.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что рекомбинантный циклофилин А человека (рЦФА) обладает иммуностимулирующим действием, направленным на усиление противоопухолевого иммунного ответа за счет активации врожденного и адаптивного иммунитета [15]. ЦФА (18 кДа) – белок из семейства изомераз, в секреторной форме выполняющий функции провоспалительного фактора [16] и хемоаттрактанта для незрелых гемопоэтических клеток [17], гранулоцитов, макрофагов, дендритных клеток и активированных Т-лимфоцитов [18]. Кроме того, ЦФА регулирует продукцию и функции других хемокинов и провоспалительных факторов [19]. Учитывая плейотропность иммуномодулирующего действия ЦФА, мы предположили, что данный фактор также способен влиять на функциональную активность Т-клеток при адоптивном переносе.

В настоящей работе исследовали влияние рЦФА на эффективность АКТ в экспериментальной модели лимфомы EL-4 мыши. В качестве источника опухолеспецифических Т-клеток использовали спленоциты трансгенных мышей 1D1a, которые врожденно имеют пул Т-клеток, способных распознавать антигены

данной опухоли [20]. Используя разработанные ранее модели отторжения лимфомы EL-4 у мышей дикого типа B10.D2(R101) [15, 20] и трансгенных мышей 1D1b [21], мы показали, что рЦФА способен значительно повышать эффективность АКТ посредством усиления эффекторных функций опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Мышей инбредной линии B10.D2(R101) ($K^dI-A^dI-E^dD^b$) получали из экспериментально-биологической лаборатории НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия). В работе также использовали мышей трансгенной линии 1D1a [20] и трансгенной линии 1D1b [21], выведенных на генетической основе B10.D2(R101), из собственной коллекции лаборатории механизмов регуляции иммунитета (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России). Экспериментальные протоколы одобрены этической комиссией ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В работе использовали самцов и самок, 18–20 г (6–8-недельного возраста). Экспериментальные группы состояли из 6–18 животных.

Анализ наличия трансгенных α - и β -цепей ТКР. Наличие трансгена в геноме мышей 1D1a и 1D1b анализировали методом ПЦР, как описано ранее [20, 21]. 1D1 α -цепь принадлежит к семейству V α 1.3, к которому нет доступных коммерческих антител [20]. По этой

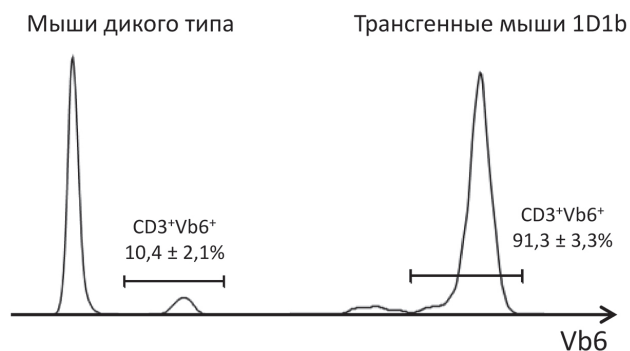


Рис. 1. Анализ экспрессии трансгенной β -цепи ТКР в Т-лимфоцитах мышей 1D1b. Цитофлуориметрический анализ Т-клеток периферической крови мышей линии B10.D2(R101) (дикий тип) и трансгенной линии 1D1b. Экспрессию трансгенной β -цепи определяли окрашиванием антителами к семейству V β 6. Относительное количество (%) $CD3^+V\beta6^+$ Т-клеток анализировали в популяции живых одиночных лимфоцитов. Данные представлены как $m \pm SEM$ ($n = 6-9$)

причине прямая оценка популяций Т-лимфоцитов мышей 1D1a, экспрессирующих трансгенную α -цепь ТКР, оказалась невозможной. Экспрессию трансгенной 1D1 β -цепи в периферических лимфоцитах мышей 1D1b подтверждали методом проточной цитофлуориметрии. Относительное количество Т-клеток, экспрессирующих трансгенную ТКР β , в периферической крови мышей 1D1b составило $91,3 \pm 3,3\%$ (рис. 1), что соответствует ранее полученным данным [21].

Клеточные линии. Клетки лимфомы EL-4 (H2-K^b) получены из коллекции ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. EL-4 прививали внутрибрюшинно (в/б) сингенным мышам C57BL/6 ($3,0\text{--}5,0 \times 10^6$ клеток/мышь) и наращивали в асцитной форме 10–14 дней. Опухолевые клетки стерильно выделяли из брюшного асцита и 3 раза отмывали в фосфатно-солевом буфере (PBS; pH 7,4) центрифугированием (200 g, 5 мин, 4 °C). Жизнеспособные клетки подсчитывали в смеси трипанового синего и эозина в камере Горяева.

Прививка EL-4. Клетки лимфомы EL-4 прививали мышам B10.D2(R101) и 1D1b в/б в дозе $3,0 \times 10^5$ клеток/мышь в 500 мкл PBS.

Подготовка клеточных суспензий. Образцы крови мышей дикого типа B10.D2(R101) и трансгенных мышей 1D1b отбирали из ретроорбитального синуса и инкубировали в лизирующем буфере («BD Pharmingen», США) для удаления эритроцитов. Затем образцы дважды промывали PBS при 200 g, 5 мин при 4 °C и окрашивали флуоресцентно мечеными антителами для последующего анализа методом проточной цитофлуориметрии. Интактных мышей линий B10.D2(R101) и 1D1a умерщвляли методом цервикальной дислокации, стерильно извлекали селезенки и осторожно выдавливали клетки из стромы органа в гомогенизаторе Поттера в 3 мл PBS. Эритроциты лизировали в лизирующем буфере, лейкоциты промывали и подсчитывали, как описано выше. Полученные суспензии спленоцитов использовали для адоптивного переноса мышам линий B10.D2(R101) и 1D1b. Мышей-реципиентов B10.D2(R101) выводили из эксперимента на 6 день после прививки клеток EL-4 и извлекали лаваж брюшной полости. Для этого в брюшную полость животных вводили шприцем 2 мл ледяного PBS и отбирали 1 мл клеточной суспензии. У мышей 1D1b извлекали клетки лаважа и селезенки на 12 день после трансплантации лимфомы EL-4 и использовали для цитофлуориметрического анализа.

Адоптивный перенос. Спленоциты мышей линий B10.D2(R101) и 1D1a в дозе $2,5 \times 10^6$ и

$5,0 \times 10^6$ вводили в/б мышам B10.D2(R101) и 1D1b в 500 мкл PBS одновременно с трансплантацией клеток EL-4.

РЧЦФА, схема введения. РЧЦФА получали, как описано ранее [22, 23]. РЧЦФА вводили в/б мышам B10.D2(R101) и 1D1b в дозе 100 мкг/мышь 1 раз в день в течение 3 дней, начиная через 3 ч после трансплантации клеток EL-4 и адоптивного переноса. Для оценки противоопухолевого эффекта рчЦФА у иммунодефицитных мышей 1D1b исследуемый белок вводили в/б в дозе 100 мкг/мышь в течение 10 дней, начиная через 3 ч после прививки лимфомы EL-4. Контрольным животным аналогично вводили PBS.

Антитела. В работе использовали моноклональные антитела: анти-CD3/FITC (клон 145-2C11) и анти-CD8/Pacific blue (клон 53-6.7) фирмы «BD Pharmingen»; анти-CD44/APC (клон IM7), анти-Vb6/PE (клон RR4-7) и анти-CD62L/APC-Cy7 (клон MEL-14) фирмы «eBioscience», США, а также анти-Kb/FITC (клон AF6-88.5) фирмы «BioLegend», США.

Цитофлуориметрический анализ. Пробы клеток ($5,0 \times 10^5$) инкубировали с блокирующими антителами Fc block (клон 2.4G2, «BD Pharmingen») (10 мин, 4 °C) и окрашивали флуоресцентно мечеными антителами (40 мин, 4 °C). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II («BD Bioscience») в программе FACSDiva 6.0 («BD Bioscience»). Лейкоциты выделяли по показателям прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеяния с последующим выделением одиночных клеток по показателям FSC-H против FSC-A (FSC-H – параметр прямого светорассеяния клетки, характеризующий высоту (H – height) пика, FSC-A – параметр, учитывающий площадь под пиком (A – area). Мертвые клетки исключали из анализа по включению йодида пропидия («BD Bioscience»). Анализ экспрессии поверхностных маркеров проводили в популяции живых одиночных лейкоцитов. При анализе образцов клеток крови, лаважа и селезенки трансгенных мышей 1D1b относительное количество Т-лимфоцитов, экспрессирующих трансгенную ТКР β , оценивали по окрашиванию анти-Vb6 антителами (семейство V β , к которому принадлежит трансгенная β -цепь 1D1b). Относительное количество опухолевых клеток EL-4 в брюшной полости экспериментальных животных определяли по экспрессии молекулы главного комплекса гистосовместимости H2-K^b (Kb). Анализ популяций Т-лимфоцитов проводили после исключения Kb-позитивных клеток. Обработку данных проводили в программе Flow Jo 7.6 («TreeStar Inc.», США).

Статистический анализ. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего ($m \pm SEM$). Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica for Windows 6.0 («StatSoft», США) и непарного критерия Стьюдента. Предварительно проводили проверку нормальности распределения выборок с использованием критерия Шапиро–Уилка для подтверждения корректности использования t -критерия Стьюдента. Различия признавали значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ранее мы показали, что адоптивный перенос 1×10^7 спленоцитов трансгенных мышей

1D1a мышам дикого типа B10.D2(R101) приводит к быстрой элиминации клеток лимфомы EL-4 в организме реципиента [20]. Для оценки влияния рчЦФА на эффективность АКТ в разработанной экспериментальной модели для адоптивного переноса использовали две дозы лимфоцитов мышей 1D1a – $2,5 \times 10^6$ и $5,0 \times 10^6$ клеток/мышь, что в 4 и 2 раза ниже установленной эффективной дозы соответственно. РчЦФА вводили животным один раз в день в течение 3 дней, т.е. по схеме, максимально приближенной к клиническим протоколам для ИЛ-2 [14].

Влияние рчЦФА на динамику отторжения лимфомы EL-4 при адоптивном переносе лимфоцитов 1D1a в дозе $2,5 \times 10^6$ клеток/мышь. Анализ клеток брюшной полости экспериментальных животных на 6 день после трансплан-

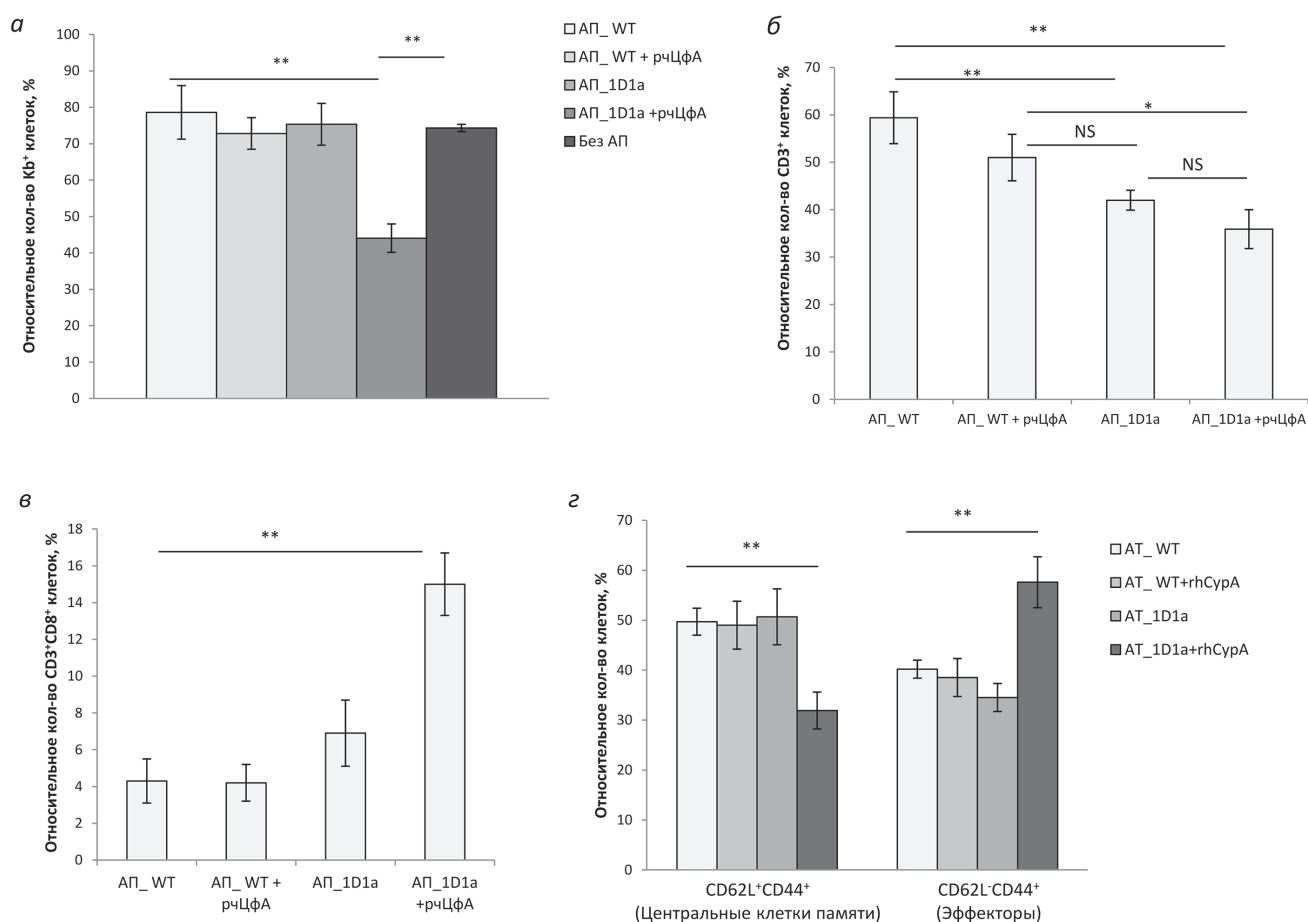


Рис. 2. Влияние рчЦФА на эффективность адоптивной клеточной терапии при дозе $2,5 \times 10^6$ лимфоцитов 1D1a/мышь. Мышам B10.D2(R101) в/б вводили спленоциты трансгенных мышей 1D1a (АП_1D1a) или мышей B10.D2(R101) (АП_ WT) в дозе $2,5 \times 10^6$ клеток/мышь одновременно с в/б трансплантацией клеток EL-4. В качестве контроля использовали мышей B10.D2(R101), аналогично привитых EL-4, но без адоптивного переноса (без АП). РчЦФА вводили в/б в дозе 100 мкг/мышь в течение 3 дней. Контрольным животным аналогично вводили PBS. Анализ клеток брюшной полости проводили методом проточной цитофлуориметрии на 6 день после трансплантации опухолевых клеток и адоптивного переноса. Относительное количество (%) клеток EL-4 (а), Т-клеток (CD3⁺) (б), цитотоксических Т-клеток (CD3⁺CD8⁺) (в) и Т-лимфоцитов CD3⁺CD8⁺ с фенотипом центральных клеток памяти (CD62L⁺CD44⁺) и эффекторов (CD62L⁻CD44⁺) (2). Данные получены в трех независимых экспериментах и представлены как $m \pm SEM$ ($n = 6-9$). NS – различия не достоверны; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (непарный критерий Стьюдента)

тации клеток EL-4 и адоптивного переноса лимфоцитов трансгенных мышей 1D1a в дозе $2,5 \times 10^6$ клеток/мышь показал, что под действием рчЦФА произошло снижение относительного количества Kb⁺-клеток в 1,7 раза по сравнению со всеми контрольными группами ($p \leq 0,01$; рис. 2, а). При этом без введения рчЦФА адоптивный перенос $2,5 \times 10^6$ трансгенных клеток не повлиял на скорость отторжения EL-4 в организме реципиентов как по сравнению с животными без адоптивного переноса, так и с группами адоптивного переноса контрольных лимфоцитов (рис. 2, а). Это указывает на неэффективность данной дозы трансгенных лимфоцитов для АКТ в этой экспериментальной системе. Стоит особо отметить, что под действием рчЦФА скорость элиминации лимфомы после адоптивного переноса лимфоцитов мышей дикого типа (АП_WT) была без изменений (рис. 2, а).

При адоптивном переносе трансгенных лимфоцитов в брюшной полости реципиентов

наблюдалось менее интенсивное накопление Т-клеток (рис. 2, б): относительное количество лимфоцитов CD3⁺ было ниже в 1,4 раза ($p \leq 0,01$) по сравнению с группой адоптивного переноса контрольных спленоцитов (АП_WT). Под действием рчЦФА произошло дальнейшее снижение относительного количества Т-клеток в 1,6 раза по сравнению с группой АП_WT ($p \leq 0,01$) и в 1,4 раза – по сравнению с группой АП_WT+рчЦФА ($p \leq 0,05$). Однако стоит отметить, что по данному показателю не было достоверных различий между группами адоптивного переноса трансгенных лимфоцитов (рис. 2, б). Введение рчЦФА при трансфузии контрольных спленоцитов не вызвало изменения в содержании CD3⁺-клеток в брюшной полости экспериментальных животных при сравнении с группой АП_WT.

Анализ доли цитотоксических лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺, ЦТЛ) в популяции Т-клеток брюшной полости реципиентов показал, что введение рчЦФА после адоптивного переноса

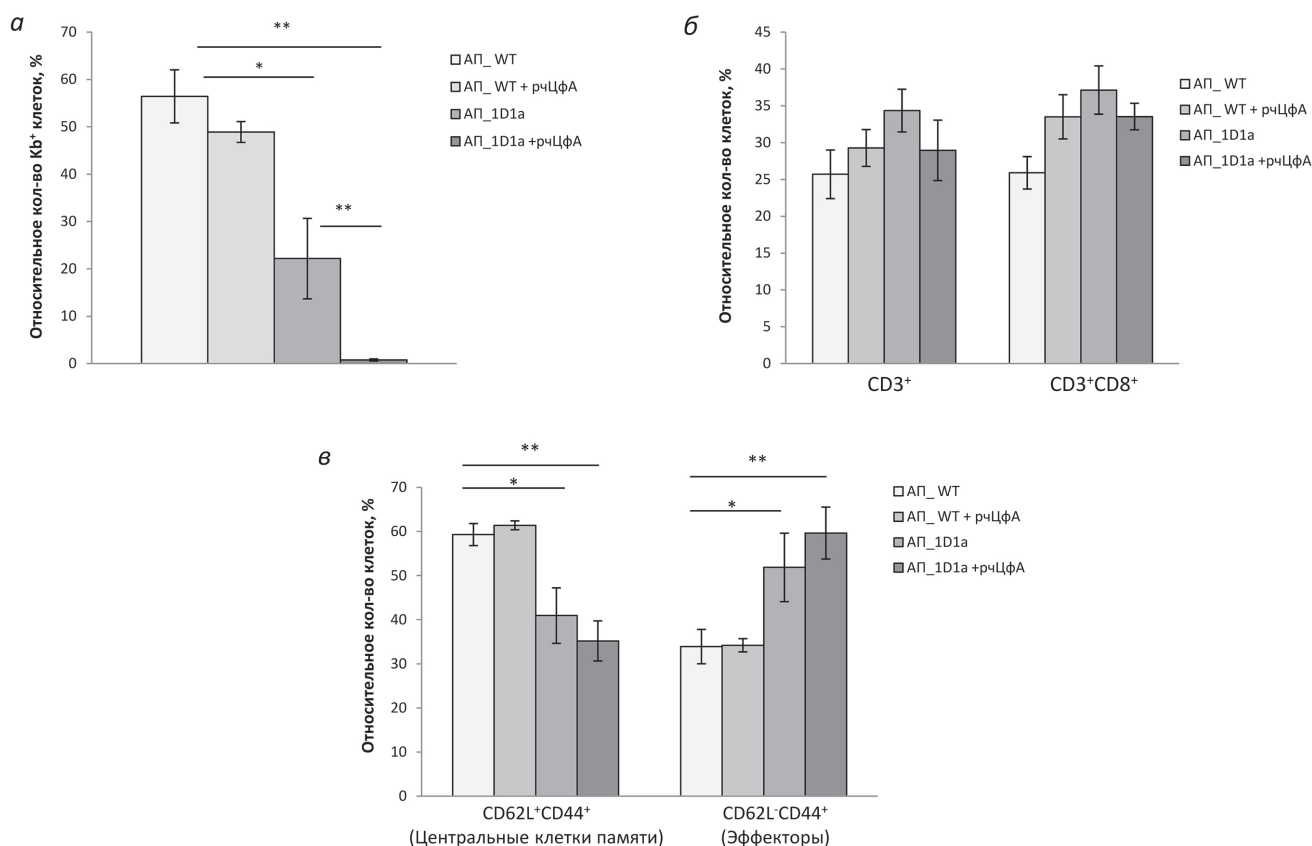


Рис. 3. Влияние рчЦФА на эффективность адоптивной клеточной терапии при дозе $5,0 \times 10^6$ лимфоцитов 1D1a/мышь. Мышам B10.D2(R101) в/б вводили спленоциты трансгенных мышей 1D1a (АП_1D1a) или мышей B10.D2(R101) (АП_WT) в дозе $5,0 \times 10^6$ клеток/мышь одновременно с в/б трансплантацией клеток EL-4. РчЦФА вводили в/б в дозе 100 мкг/мышь в течение 3 дней. Контрольным животным аналогично вводили PBS. Анализ клеток брюшной полости проводили методом проточной цитометрии на 6 день после трансплантации опухолевых клеток и адоптивного переноса. Относительное количество (%) клеток EL-4 (а), Т-клеток (CD3⁺) и цитотоксических Т-клеток (CD3⁺CD8⁺) (б), Т-лимфоцитов CD3⁺CD8⁺ с фенотипом центральных клеток памяти (CD62L⁺CD44⁺) и эффекторов (CD62L⁻CD44⁺) (в). Данные получены в трех независимых экспериментах и представлены как $m \pm SEM$ ($n = 6-9$). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (непарный критерий Стьюдента)

трансгенных лимфоцитов увеличило долю ЦТЛ в 2,2 раза по сравнению с группой АП_1D1a и в 3,6 раза — по сравнению с обеими группами адоптивного переноса контрольных клеток ($p \leq 0,01$; рис. 2, в). Данный эффект рЧЦФА отсутствовал при трансфузии спленоцитов мышей дикого типа (рис. 2, в). Собственно адоптивный перенос лимфоцитов мышей 1D1a не вызывал изменения относительного количества ЦТЛ в брюшной полости экспериментальных животных.

Кроме того, исключительно после введения рЧЦФА в группе мышей-реципиентов трансгенных спленоцитов наблюдалось локальное накопление эффекторных ЦТЛ, доля которых была увеличена в 1,7 раза по сравнению со всеми контрольными группами ($p \leq 0,01$; рис. 2, г) за счет пропорционального снижения относительного количества Т-клеток с фенотипом центральных клеток памяти (рис. 2, г).

Влияние рЧЦФА на динамику отторжения лимфомы EL-4 при адоптивном переносе лимфоцитов 1D1a в дозе $5,0 \times 10^6$ клеток/мышь. При адоптивном переносе $5,0 \times 10^6$ лимфоцитов трансгенных мышей 1D1a наблюдалось снижение относительного количества клеток лимфомы EL-4 в брюшной полости реципиентов в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой адоптивного переноса АП_WT ($p \leq 0,05$; рис. 3, а), что указывает на частичную эффективность данной дозы трансгенных клеток. При этом введение рЧЦФА способствовало усилению эффективности АКТ и привело к практически полной элиминации опухолевых клеток из организма мышей-реципиентов к 6 дню после трансплантации EL-4 (рис. 3, а). Данный эффект рЧЦФА не наблюдался после адоптивного переноса лимфоцитов мышей дикого типа (АП_WT; рис. 3, а).

При анализе относительного количества Т-лимфоцитов ($CD3^+$) и ЦТЛ ($CD3^+CD8^+$) в брюшной полости мышей-реципиентов не было выявлено достоверных различий ни в одной исследуемой группе (рис. 3, б). Однако адоптивный перенос трансгенных лимфоцитов 1D1a привел к увеличению доли $CD8^+$ -эффекторов ($CD62L-CD44^+$) в 1,5–1,7 раза по сравнению с группами адоптивного переноса контрольных спленоцитов (рис. 3, в). Стоит отметить, что у реципиентов трансгенных клеток на фоне введения рЧЦФА доля эффекторных ЦТЛ в брюшной полости не отличалась от значений в контрольной группе АП_1D1a (рис. 3, в), что может указывать на начало контракции эффекторной фазы иммунного ответа ввиду полной элиминации специфического антигена (рис. 3, а).

Влияние рЧЦФА на развитие противоопухолевого иммунного ответа у иммунодефицитных трансгенных мышей 1D1b. Для подтверждения способности рЧЦФА повышать эффективность разработанной экспериментальной АКТ в дальнейшей работе использовали трансгенных мышей 1D1b, которые не способны развивать полноценный иммунный ответ и отторгать аллогенную лимфому EL-4 вследствие суженного репертуара ТКР у этих мышей [21, 24].

Ранее мы показали, что под действием рЧЦФА у трансгенных мышей 1D1b в ответе на лимфому EL-4 значительно увеличивается пул эффекторных $CD8^+$ -клеток, экспрессирующих трансгенную β -цепь ТКР (ТКР β) [15]. В настоящей работе мы более детально изучили влияние рЧЦФА на развитие противоопухолевого иммунного ответа у этих иммунодефицитных животных. Для этого исследуемый белок вводили в течение 10 дней после трансплантации клеток лимфомы EL-4 и на 12 день анализировали популяции клеток брюшной полости (рис. 4, а и б) и селезенки (рис. 4, в–д).

Исследование клеток брюшной полости мышей 1D1b показало, что курсовое введение рЧЦФА способствовало достоверному (в 1,8 раза; $p \leq 0,05$) снижению абсолютного количества опухолевых клеток по сравнению с контролем к 12 дню после трансплантации лимфомы EL-4 (рис. 4, а). Это сопровождалось увеличением доли Т-клеток почти в 3,0 раза по сравнению с контрольной группой без рЧЦФА и интактными мышами без опухоли (рис. 4, б). Стоит отметить, что при этом достоверно снизилось относительное количество Т-клеток с трансгенной ТКР β ($p \leq 0,05$; рис. 4, б). Эти данные указывают на то, что под действием рЧЦФА индуцируется инфильтрация опухоли Т-лимфоцитами, экспрессирующими как трансгенную, так и эндогенные β -цепи ТКР.

В селезенке мышей 1D1b после введения рЧЦФА отмечалось достоверное увеличение относительного количества ЦТЛ ($p \leq 0,05$; рис. 4, в) без изменения соотношения $Vb6^+/Vb6^- CD8^+$ -лимфоцитов (рис. 4, г). При этом наблюдалось увеличение доли эффекторных ЦТЛ в популяции Т-лимфоцитов, экспрессирующих трансгенную ТКР β (в 4,0 раза по сравнению с контролями), в основном за счет снижения относительного количества наивных клеток ($p \leq 0,01$; рис. 4, д, 1–3). Аналогичным образом введение рЧЦФА привело к достоверному повышению относительного количества эффекторов среди Т-клеток с эндогенными β -цепями ТКР ($p \leq 0,05$ по сравнению с контрольными группами; рис. 4, д, 4–6). Это согласуется с результатами анализа клеток брюшной полости (рис. 4, б)

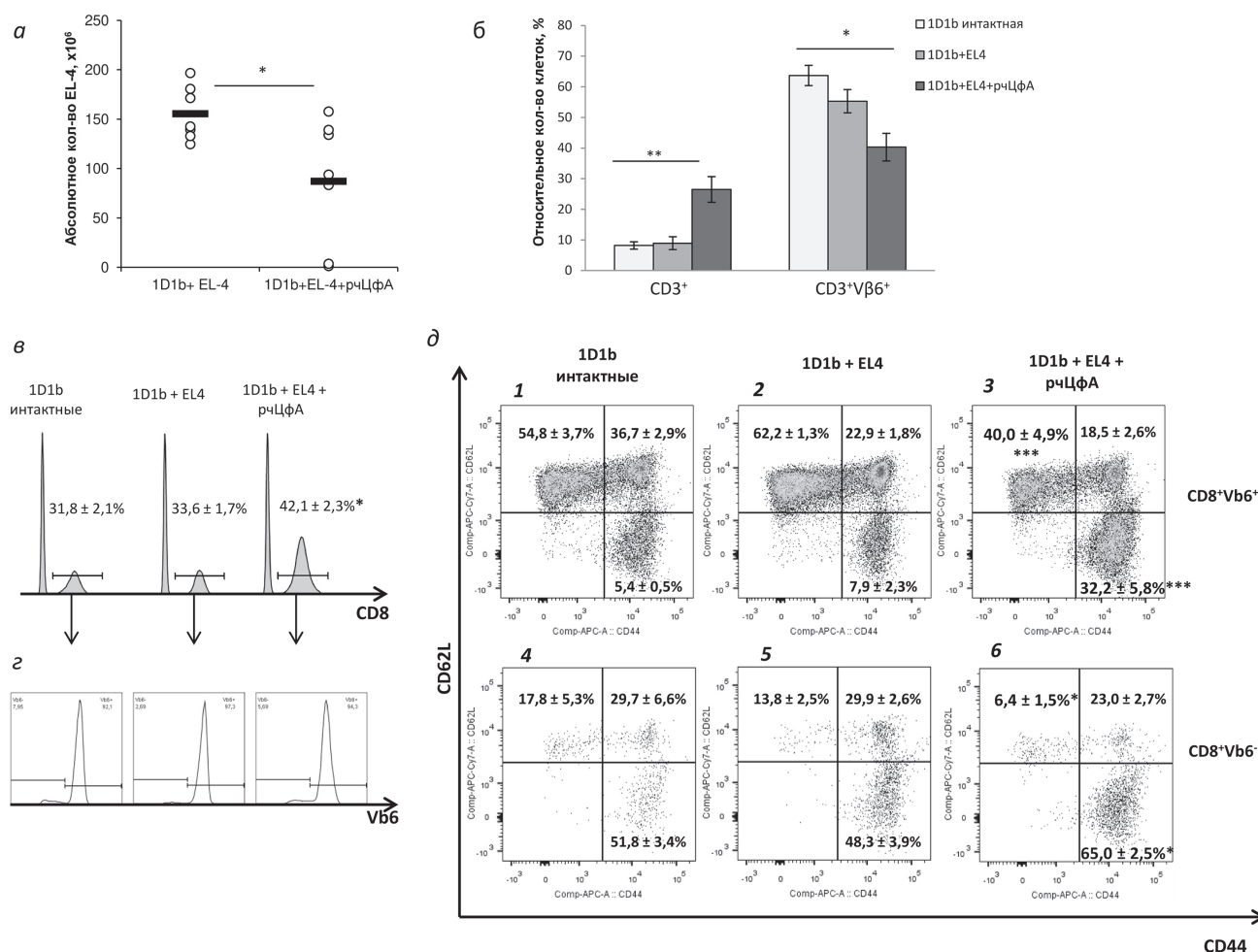


Рис. 4. Анализ клеток брюшной полости и селезенки мышей 1D1b после трансплантации лимфомы EL-4. Мышам трансгенной линии 1D1b в/б трансплантировали $3,0 \times 10^5$ клеток EL-4 и в/б вводили рЧЦФА в дозе 100 мкг/мышь в течение 10 дней. Контрольным животным аналогично вводили PBS. На 12 день анализировали клеточный состав в лаваже брюшной полости (а и б) и селезенке (в–д) экспериментальных животных. а – Абсолютное количество опухолевых клеток ($\times 10^6$). б – Относительное количество (%) Т-клеток (CD3⁺) и Т-клеток, экспрессирующих трансгенную β -цепь ТКР (CD3⁺Vb6⁺); в – относительное количество (%) цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺); г – относительное количество (%) CD3⁺CD8⁺ Т-клеток селезенки, экспрессирующих трансгенную β -цепь ТКР (Vb6⁺); д – относительное количество (%) CD3⁺CD8⁺ Т-клеток селезенки с фенотипом наивных клеток (CD62L⁺CD44⁻), центральных клеток памяти (CD62L⁺CD44⁺) и эффекторов (CD62L⁻CD44⁺). Индивидуальный анализ популяций CD3⁺CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих трансгенную β -цепь ТКР (CD8⁺Vb6⁺) (д, 1–3) или эндогенные β -цепи ТКР (CD8⁺Vb6⁻) (д, 4–6). Данные получены в трех независимых экспериментах и представлены как $m \pm SEM$ ($n = 7-8$). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (непарный критерий Стьюдента)

и подтверждает вовлечение обеих субпопуляций Т-клеток, экспрессирующих трансгенную ТКР β (Vb6⁺) или эндогенные варианты ТКР β (Vb6⁻), в ответ на клетки EL-4 под действием рЧЦФА.

Курсовое введение рЧЦФА также привело к достоверному увеличению продолжительности жизни мышей 1D1b с привитой лимфомой EL-4 ($30,2 \pm 3,9$ дней по сравнению с $20,2 \pm 1,2$ днями в контрольной группе; $p \leq 0,05$; рис. 5). Более того, под действием рЧЦФА у 10% трансгенных мышей произошло полное отторжение лимфомы EL-4 без признаков роста опухоли при наблюдении более 100 дней (рис. 5).

Влияние рЧЦФА на эффективность адоптивной клеточной терапии в трансгенной модели 1D1b. При оценке влияния рЧЦФА на эффективность АКТ в модели иммунодефицитных мышей 1D1b для адоптивного переноса использовали спленоциты трансгенных мышей 1D1a в обеих исследуемых дозах ($2,5 \times 10^6$ и $5,0 \times 10^6$ клеток/мышь).

Инфузия трансгенных лимфоцитов мышам 1D1b в дозе $2,5 \times 10^6$ клеток/мышь достоверно увеличила продолжительность жизни реципиентов с привитой лимфомой EL-4 по сравнению со всеми контрольными группами ($p \leq 0,05$; рис. 6, а). Курсовое (3-дневное) введение рЧЦФА значительно улучшило эффек-

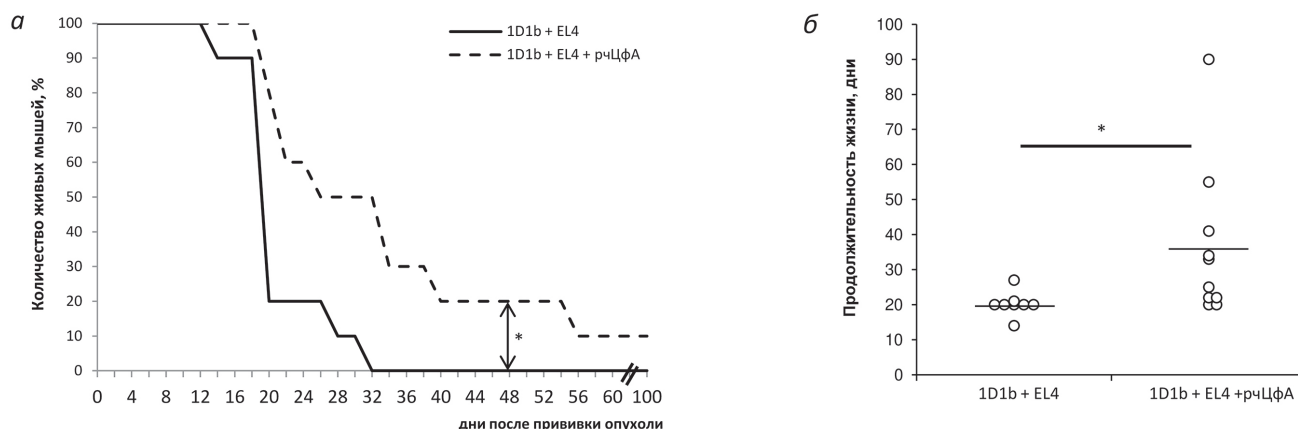


Рис. 5. Влияние рЧЦФА на продолжительность жизни трансгенных мышей 1D1b после прививки клеток лимфомы EL-4. Мышам трансгенной линии 1D1b в/б трансплантировали $3,0 \times 10^5$ клеток EL-4 и в/б вводили рЧЦФА в дозе 100 мкг/мышь в течение 10 дней. Контрольным животным аналогично вводили PBS. *а* – Динамика гибели животных. *б* – Продолжительность жизни животных ($n = 10$). * $p \leq 0,05$ (непарный критерий Стьюдента)

тивность АКТ, повысив срок жизни мышей 1D1b в 1,5 раза по сравнению с группой АП_1D1a ($44,0 \pm 1,1$ дня и $28,8 \pm 1,5$ дня соответственно; рис. 6, *а*). При этом продолжительность жизни мышей-реципиентов после инъекций рЧЦФА увеличилась в 2,0 раза по сравнению с животными без терапии и группами адоптивного переноса контрольных лимфоцитов (рис. 6, *а*).

Адоптивный перенос $5,0 \times 10^6$ лимфоцитов мышей 1D1a трансгенным мышам 1D1b увеличил продолжительность жизни реципиентов в 2,0 раза по сравнению со всеми контрольными группами животных (рис. 6, *б*). Кроме того, около 20% мышей 1D1b (4 из 18) полностью отторгли лимфому EL-4 без признаков роста опухоли при наблюдении более 120 дней (рис. 6, *в*). После курсового введения рЧЦФА количество выживших реципиентов увеличилось почти вдвое (38,8%; 7 из 18) по сравнению с группой АП_1D1a (рис. 6, *в*), что свидетельствует об усилении эффективности АКТ при использовании данной дозы лимфоцитов мышей 1D1a.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее в нашей лаборатории была получена трансгенная линия мышей 1D1a, Т-лимфоциты которых экспрессируют α -цепь центрического ТКР клеток памяти, распознающего молекулу МНС I класса H2-K^b [20]. Вследствие этого трансгенные мыши 1D1a врожденно имеют пул Т-клеток, специфичных к H2-K^b, и способны ускоренно отторгать лимфому EL-4, экспрессирующую данный аллоантиген [20]. Экспериментальную модель, в которой спле-

ноциты трансгенных мышей 1D1a служили источником опухолеспецифических Т-клеток [20], использовали в настоящей работе для исследования влияния рЧЦФА на эффективность АКТ.

Было показано, что курсовое введение рЧЦФА при адоптивном переносе трансгенных 1D1a лимфоцитов в количестве в 2–4 раза ниже эффективной дозы [20] значительно стимулирует отторжение специфической опухоли в организме реципиентов (рис. 2, *а* и 3, *а*). Этот эффект был обусловлен локальным накоплением эффекторных ЦТЛ посредством дифференцировки из Т-лимфоцитов с фенотипом центральных клеток памяти (рис. 2, *г*). Полученные данные согласуются с результатами нашего предыдущего исследования, в котором было показано, что у трансгенных мышей 1D1a в ответе на EL-4 именно центральные клетки памяти становятся источником эффекторных ЦТЛ [20].

Для подтверждения наблюдаемых эффектов рЧЦФА мы использовали трансгенных мышей 1D1b – уникальную модель иммунодефицитного состояния, обусловленного сокращением разнообразия репертуара ТКР вследствие экспрессии трансгенной β -цепи ТКР [24]. Было показано, что β -цепь 1D1b не определяет антигенную специфичность исходного рецептора [20, 24] и в комплексе с эндогенными α -цепями формирует узкий репертуар ТКР с ограниченным количеством клонотипов, способных распознавать специфический антиген (молекулу МНС I класса H2-K^b). Вследствие этого Т-клетки, экспрессирующие трансгенную ТКР β , образуют небольшое количество эффекторов в ответ на клетки аллогенной лимфомы EL-4, несущей H2-K^b [21, 24]. В организме трансгенных мышей 1D1b формируется также минорный

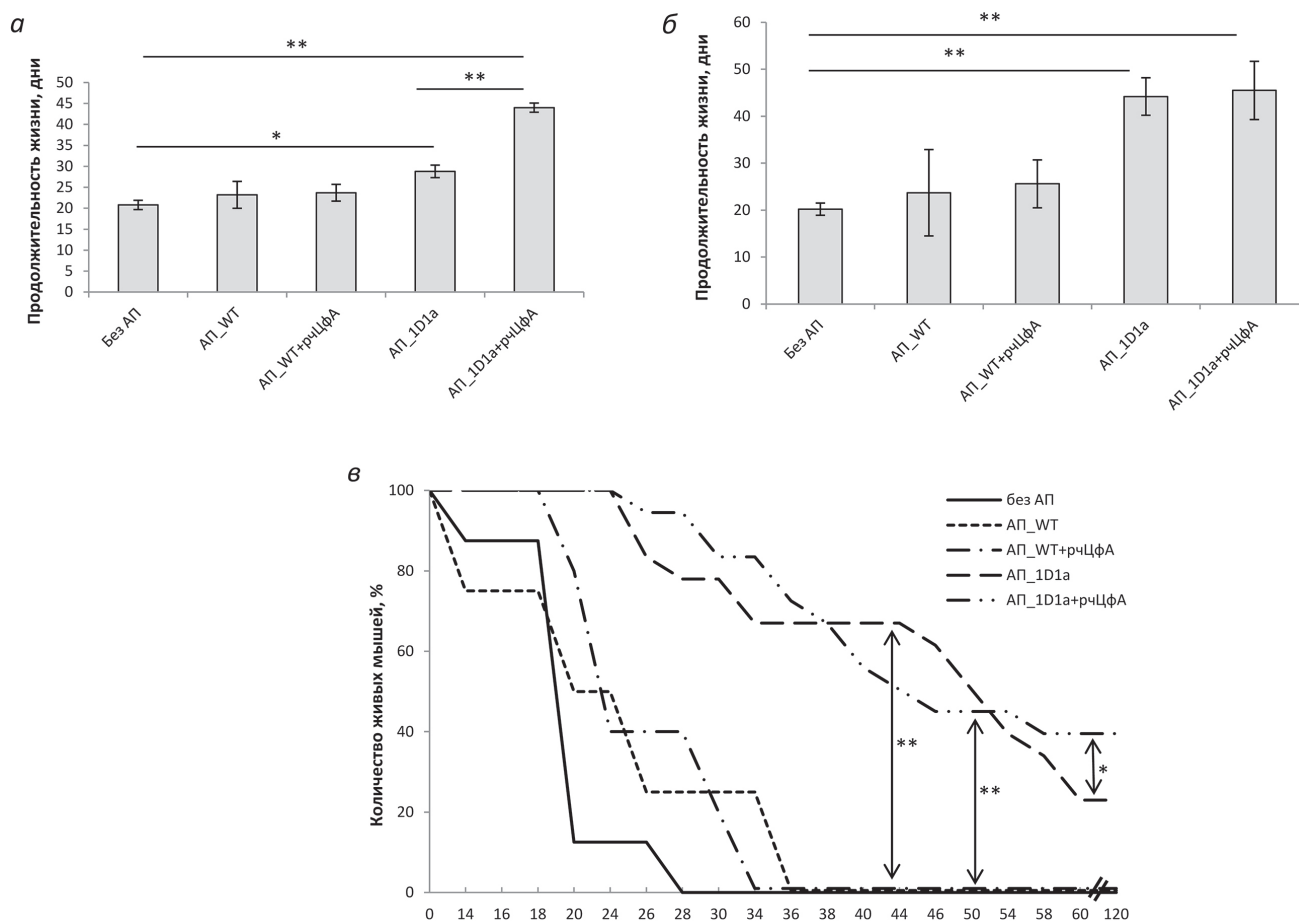


Рис. 6. Влияние рЧЦФА на эффективность адоптивной клеточной терапии в модели иммунодефицитных мышей 1D1b. Мышам трансгенной линии 1D1b в/б вводили спленциты трансгенных мышей 1D1a (АП_1D1a) или мышей B10.D2(R101) (АП_WT) в дозе $2,5 \times 10^6$ клеток/мышь (а) и $5,0 \times 10^6$ клеток/мышь (б и в) одновременно с в/б трансплантацией клеток EL-4. В/б инъекции рЧЦФА в дозе 100 мкг/мышь проводили в течение 3 дней. Контрольным животным аналогично вводили PBS. а и б – Продолжительность жизни животных ($n = 7-18$). в – Динамика гибели животных ($n = 10-18$). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (непарный критерий Стьюдента)

пул Т-клеток (~10%) с эндогенными β -цепями, разнообразие которых не ограничено, и, следовательно, он способен распознавать EL-4. Однако из-за низкой численности этих клонотипов их оказывается недостаточно для развития полноценного иммунного ответа и элиминации опухолевых клеток [24]. Таким образом, иммунодефицитные трансгенные мыши 1D1b являются удобной моделью для оценки эффективности АКТ, так как эта экспериментальная система позволяет минимизировать вклад иммунитета реципиента в ответ на опухолевые клетки.

В данной экспериментальной системе было показано, что курсовое (3-дневное) введение рЧЦФА значительно повышает терапевтический эффект адоптивного переноса опухолеспецифических Т-лимфоцитов мышам 1D1b, в 2 раза увеличивая продолжительность жизни животных с привитой лимфомой EL-4 (рис. 6). Более того, под действием рЧЦФА около 40% реципиентов выживает после АКТ, полно-

стью отторгнув опухоль, что в 2 раза выше показателя для АКТ без введения рЧЦФА (рис. 6, в).

Полученные данные указывают на способность рЧЦФА стимулировать эффекторные функции опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов, таким образом значительно повышая эффективность АКТ. Учитывая отсутствие токсических эффектов рЧЦФА в широком диапазоне доз [25], результаты настоящей работы открывают широкие перспективы для оптимизации протоколов АКТ, исключая необходимость длительного и трудоемкого наращивания *in vitro* требуемого количества Т-лимфоцитов для адоптивного переноса, и разработки более успешных и безопасных стратегий адоптивной иммунотерапии злокачественных новообразований с использованием рЧЦФА как альтернативы существующим подходам цитокиновой терапии [11, 14].

Кроме того, в модели иммунодефицитных трансгенных мышей 1D1b без АКТ было

показано, что рЧЦФА, как хемоаттрактант, стимулирует накопление Т-лимфоцитов по месту локализации опухоли, при этом большую часть составляют Т-клетки с эндогенными ТКРβ (60%; рис. 4, б), т.е. с более широким диапазоном специфичностей. Также под влиянием рЧЦФА у мышей 1D1b в ответе на клетки лимфомы EL-4 системно (в селезенке) накапливаются как эффекторы, экспрессирующие трансгенную ТКРβ, так и эффекторы с эндогенными вариантами ТКРβ (рис. 4, д). Это позволяет предположить, что под действием рЧЦФА ограниченное количество клонотипов Т-клеток мыши 1D1b, способных распознавать антигены лимфомы EL-4, подвергаются клональной экспансии и формируют более эффективный пул ЦТЛ. Это обуславливает интенсивное отторжение опухолевых клеток на ранних сроках и достоверное увеличение продолжительности жизни трансгенных мышей-опухоленосителей (рис. 5).

Сокращенный репертуар ТКР и низкая численность клонотипов Т-клеток, способных распознавать опухолевые антигены, служат серьезным препятствием для развития полноценного адаптивного противоопухолевого иммунного ответа, позволяя опухоли избежать иммунологического контроля и быстро прогрессировать. Терапия, направленная на активацию и экспансию опухолеспецифических Т-клеток, может повысить скорость элиминации трансформиро-

ванных клеток, снизить темпы иммуноредактирования опухоли и формирования супрессорного микроокружения. Продемонстрированный в настоящем исследовании иммуностимулирующий эффект рЧЦФА может потенциально использоваться для коррекции противоопухолевого ответа иммунодефицитных пациентов на ранних стадиях развития опухоли.

Вклад авторов. А.А. Калинина, Л.М. Хромых, Д.Б. Казанский — концепция; Л.М. Хромых, Д.Б. Казанский — руководство работой; А.А. Калинина — проведение экспериментов; А.А. Калинина, Л.М. Хромых, Д.Б. Казанский — обсуждение результатов исследования; А.А. Калинина — написание текста статьи; Л.М. Хромых, Д.Б. Казанский, А.А. Калинина — редактирование текста статьи; А.А. Калинина — получение финансирования. Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-75-00004), <http://rscf.ru/project/22-75-00004/>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Met, Ö., Jensen, K., Chamberlain, C., Donia, M., and Svane, I. (2019) Principles of adoptive T cell therapy in cancer, *Semin. Immunopathol.*, **41**, 49–58, doi: 10.1007/s00281-018-0703-z.
2. Zhang, H., and Chen, J. (2018) Current status and future directions of cancer immunotherapy, *J. Cancer.*, **9**, 1773–1781, doi: 10.7150/jca.24577.
3. Zhao, Q., Jiang, Y., Xiang, S., Kaboli, P., Shen, J., Zhao, Y., Wu, X., Du, F., Li, M., Cho, C., Li, J., Wen, Q., Liu, T., Yi, T., and Xiao, Z. (2021) Engineered TCR-T cell immunotherapy in anticancer precision medicine: pros and cons, *Front. Immunol.*, **12**, 658753, doi: 10.3389/fimmu.2021.658753.
4. June, C., O'Connor, R., Kawalekar, O., Ghassemi, S., and Milone, M. (2018) CAR T cell immunotherapy for human cancer, *Science*, **359**, 1361–1365, doi: 10.1126/science.aar6711.
5. Mescher, M., Popescu, F., Gerner, M., Hammerbeck, C., and Curtsinger, J. (2007) Activation-induced non-responsiveness (anergy) limits CD8 T cell responses to tumors, *Semin. Cancer Biol.*, **17**, 299–308, doi: 10.1016/j.semcancer.2007.06.008.
6. William, Y., Ho, C., and Greenberg, P. (2002) Adoptive therapy with CD8⁺ T cells: it may get by with a little help from its friends, *J. Clin. Invest.*, **110**, 1415–1417, doi: 10.1172/JCI17214.
7. Srivastava, S., and Riddell, S. (2018) Chimeric antigen receptor T cell therapy: challenges to bench-to bedside efficacy, *J. Immunol.*, **200**, 459–468, doi: 10.4049/jimmunol.1701155.
8. Yamamoto, T., Lee, P., Vodnala, S., Gurusamy, D., Kishton, R., Yu, Z., Eidizadeh, A., Eil, R., Fioravanti, J., Gattinoni, L., Kochenderfer, J., Fry, T., Aksoy, B., Hammerbacher, J., Cruz, A., Siegel, R., Restifo, N., and Klebanoff, C. (2019) T cells genetically engineered to overcome death signaling enhance adoptive cancer immunotherapy, *J. Clin. Invest.*, **129**, 1551–1565, doi: 10.1172/JCI121491.
9. Chandran, S., Somerville, R., Yang, J., Sherry, R., Klebanoff, C., Goff, S., Wunderlich, J., Danforth, D., Zlott, D., Paria, B., Sabesan, A., Srivastava, A., Xi, L., Pham, T., Raffeld, M., White, D., Toomey, M., Rosenberg, S., and Kammula, U. (2017) Treatment of metastatic uveal melanoma with adoptive transfer of

- tumour-infiltrating lymphocytes: a single-centre, two-stage, single-arm, phase 2 study, *Lancet Oncol.*, **18**, 792-802, doi: 10.1016/S1470-2045(17)30251-6.
10. Veatch, J., Lee, S., Fitzgibbon, M., Chow, I., Jesernig, B., Schmitt, T., Kong, Y., Kargl, J., Houghton, A., Thompson, J., McIntosh, M., Kwok, W., and Riddell, S. (2018) Tumor-infiltrating BRAFV600E-specific CD4⁺ T cells correlated with complete clinical response in melanoma, *J. Clin. Invest.*, **128**, 1563-1568, doi: 10.1172/JCI98689.
 11. Berraondo, P., Sanmamed, M., Ochoa, M., Etcheberria, I., Aznar, M., Pérez-Gracia, J., Rodríguez-Ruiz, M., Ponz-Sarvisé, M., Castañón, E., and Melero, I. (2019) Cytokines in clinical cancer immunotherapy, *Br. J. Cancer*, **120**, 6-15, doi: 10.1038/s41416-018-0328-y.
 12. Choudhry, H., Helmi, N., Abdulaal, W., Zeyadi, M., Zamzami, M., Wu, W., Mahmoud, M., Warsi, M., Rasool, M., and Jamal, M. (2018) Prospects of IL-2 in cancer immunotherapy, *Biomed. Res. Int.*, **2018**, 9056173, doi: 10.1155/2018/9056173.
 13. Rosenberg, S., Yang, J., White, D., and Steinberg, S. (1998) Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response, *Ann. Surg.*, **228**, 307-319, doi: 10.1097/0000658-199809000-00004.
 14. Nguyen, L., Saibil, S., Sotov, V., Le, M., Khoja, L., Ghazarian, D., Bonilla, L., Majeed, H., Hogg, D., Joshua, A., Crump, M., Franke, N., Spreafico, A., Hansen, A., Al-Habeeb, A., Leong, W., Easson, A., Reedijk, M., Goldstein, D., McCready, D., Yasufuku, K., Waddell, T., Cypel, M., Pierre, A., Zhang, B., Boross-Harmer, S., Cipollone, J., Nelles, M., Scheid, E., Fyrsta, M., Lo, C., Nie, J., Yam, J., Yen, P., Gray, D., Motta, V., Elford, A., DeLuca, S., Wang, L., Effendi, S., Ellenchery, R., Hirano, N., Ohashi, P., and Butler, M. (2019) Phase II clinical trial of adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and low-dose interleukin-2, *Cancer Immunol. Immunother.*, **68**, 773-785, doi: 10.1007/s00262-019-02307-x.
 15. Kalinina, A., Silaeva, Yu., Kazansky, D., and Khromykh, L. (2019) The role of recombinant human Cyclophilin A in the antitumor immune response, *Acta Naturae*, **11**, 63-67, doi: 10.32607/20758251-2019-11-2-63-67.
 16. Nigro, P., Pompilio, G., and Capogrossi, M. (2013) Cyclophilin A: a key player for human disease, *Cell Death Dis.*, **4**, e888, doi: 10.1038/cddis.2013.410.
 17. Khromykh, L., Kulikova, N., Anfalova, T., Muranova, T., Abramov, V., Vasiliev, A., Khlebnikov, V., and Kazansky, D. (2007) Cyclophilin A produced by thymocytes regulates the migration of murine bone marrow cells, *Cell. Immunol.*, **249**, 46-53, doi: 10.1016/j.cellimm.2007.11.002.
 18. Xu, Q., Leiva, M., Fischkoff, S., Handschumacher, R., and Lyttle, C. (1992) Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin, *J. Biol. Chem.*, **267**, 11968-11971.
 19. Dawar, F., Xiong, Y., Khattak, M., Li, J., Lin, L., Mei, J. (2017) Potential role of cyclophilin A in regulating cytokine secretion, *J. Leukoc. Biol.*, **102**, 989-992, doi: 10.1189/jlb.3RU0317-090RR.
 20. Zamkova, M., Kalinina, A., Silaeva, Y., Persiyantseva, N., Bruter, A., Deikin, A., Khromykh, L., and Kazansky, D. (2019) Dominant role of the α -chain in rejection of tumor cells bearing a specific alloantigen in TCR α transgenic mice and in *in vitro* experiments, *Oncotarget*, **10**, 4808-4821, doi: 10.18632/oncotarget.27093.
 21. Silaeva, Y., Kalinina, A., Vagida, M., Khromykh, L., Deikin, A., Ermolkevich, T., Sadchikova, E., Goldman, I., and Kazansky, D. (2013) Decrease in pool of T lymphocytes with surface phenotypes of effector and central memory cells under influence of TCR transgenic β -chain expression, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 549-559, doi: 10.1134/S0006297913050143.
 22. Kalinina, A., Kolesnikov, A., Kozyr, A., Kulikova, N., Zamkova, M., Kazansky, D., and Khromykh, L. (2022) Preparative production and purification of recombinant human Cyclophilin A, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 259-268, doi: 10.1134/S0006297922030063.
 23. Khromykh, L. M., Kalinina, A. A., Kozyr, A. V., Kolesnikov, A. V., Silaeva, Yu. Yu., and Kazansky, D. B. Patent № 2603283, Russian Federation, 2015.
 24. Silaeva, Y., Grinenko, T., Vagida, M., Kalinina, A., Khromykh, L., and Kazansky, D. (2014) Immune selection of tumor cells in TCR β -chain transgenic mice, *J. Immunotoxicol.*, **11**, 393-399, doi: 10.3109/1547691X.2013.861548.
 25. Kalinina, A., Zamkova, M., Antoshina, E., Trukhanova, L., Gorkova, T., Kazansky, D., and Khromykh, L. (2019) Analyses of the toxic properties of recombinant human Cyclophilin A in mice, *J. Immunotoxicol.*, **16**, 182-190, doi: 10.1080/1547691X.2019.1665597.

RECOMBINANT HUMAN CYCLOPHILIN A IN COMBINATION WITH ADOPTIVE T CELL THERAPY IMPROVES THE EFFICACY OF CANCER IMMUNOTHERAPY IN EXPERIMENTAL MODELS *in vivo*

A. A. Kalinina*, D. B. Kazansky, and L. M. Khromykh

*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation,
115478 Moscow, Russia; E-mail: aakalinina89@gmail.com*

Adoptive T-cell therapy (ACT) is successfully applied in cancer treatment, however, its efficiency can be limited by a low viability, short persistence time, and loss of functional activity of T cells after adoptive transfer. The search for novel immunomodulators that can improve the viability, expansion, and functions of T cells after their infusion with the minimal side effects could contribute to the development of more efficient and safe ACT strategies. Recombinant human cyclophilin A (rhCypA) is of particular interest in this respect, as it exhibits pleiotropic immunomodulatory activity and stimulates both innate and adaptive anti-tumor immunity. Here, we evaluated the effect of rhCypA on the efficacy of ACT in the mouse EL4 lymphoma model. Lymphocytes from transgenic 1D1a mice with an inborn pool of EL4-specific T cells were used as a source of tumor-specific T cells for ACT. In models of immunocompetent and immunodeficient transgenic mice, the course (3 days) rhCypA administration was shown to significantly stimulate EL4 rejection and prolong the overall survival of tumor-bearing mice after adoptive transfer of lowered doses of transgenic 1D1a cells. Our studies showed that rhCypA significantly improved the efficacy of ACT by enhancing the effector functions of tumor-specific cytotoxic T cells. These findings open up the prospects for the development of innovative strategies of adoptive T-cell immunotherapy for cancer using rhCypA as an alternative to existing cytokine therapies.

Keywords: cyclophilin A, adoptive cell therapy, cytokine therapy, anti-cancer therapy, T-cell receptor, cytotoxic T lymphocyte, immunodeficiency, transgenesis