

© 2025 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 05.06.2025
Принята к печати 26.06.2025



EDN: VTJSEB

DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-14-26

Доклиническая разработка протокола производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов для терапии T-линейных острых лимфобластных лейкозов и лимфом

Э.Я. Мусаева¹, Е.А. Малахова^{1,2}, В.А. Ведмедская¹, А.А. Дудорова¹, Д.С. Осипова¹, Д.В. Волков³, А.С. Чернов³, А.С. Федорова¹, М.С. Фадеева¹, О.Б. Лодоева¹, Е.А. Кулаковская¹, Т.А. Созонова¹, А.В. Степанов¹, Д.Е. Першин¹, М.А. Масчан¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пушкино

³ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва

Разработка методов клеточной терапии T-линейного острого лимфобластного лейкоза является актуальной задачей. В настоящем исследовании представлен доклинический этап разработки анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов в условиях отсутствия дополнительных генетических модификаций за счет естественной down-регуляции маркера CD5. Полученные клеточные продукты продемонстрировали удовлетворительные показатели кратности экспансии и доли CAR-экспрессирующих клеток, преобладание Tem-фенотипа (CD197-CD45RA⁻), низкие уровни экспрессии маркеров истощения (PD-1, CD57, TIGIT). Функциональная активность была продемонстрирована как *in vitro* посредством оценки дегрануляции, синтеза цитокинов и цитотоксичности в отношении клеточной линии Jurkat, так и *in vivo* посредством исследования элиминации CD5⁺-лейкоза на мышинной модели. Полученные данные могут быть использованы для формирования клинического протокола производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, иммунотерапия, CAR-T-клеточная терапия

Мусаева Э.Я. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2025; 24 (2): 14–26.
DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-14-26

Preclinical development of a protocol for the manufacturing of anti-CD5 CAR-T lymphocytes for the treatment of T-lineage acute lymphoblastic leukemia and lymphoma

E.Ya. Musaeva¹, E.A. Malakhova^{1,2}, V.A. Vedmedskaia¹, A.A. Dudorova¹, D.S. Osipova¹, D.V. Volkov³, A.S. Chernov³, A.S. Fedorova¹, M.S. Fadeeva¹, O.B. Lodoeva¹, E.A. Kulakovskaya¹, T.A. Sozonova¹, A.V. Stepanov¹, D.E. Pershin¹, M.A. Maschan¹

¹The Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino

³The Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

The development of cell therapy methods for T-lineage acute lymphoblastic leukemia remains a relevant clinical challenge. The current study presents a preclinical stage of anti-CD5 CAR-T cell development without the use of additional genetic modifications, relying on down-regulation of CD5. The resulting cell products demonstrated sufficient expansion rates and CAR expression levels, the predominance of the Tem phenotype (CD197-CD45RA⁻) and low expression of exhaustion markers (PD-1, CD57, TIGIT). The antitumor function was confirmed both *in vitro* through the assessment of degranulation, cytokine production, and cytotoxicity against the Jurkat cell line, and *in vivo* through the evaluation of CD5⁺ leukemia elimination in a murine model. The data obtained may serve as a basis for the development of a clinical manufacturing protocol for anti-CD5 CAR-T cells. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, immunotherapy, CAR T-cell therapy

Musaeva E.Ya., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2025; 24 (2): 14–26.
DOI: 10.24287/1726-1708-2025-24-2-14-26

Контактная информация:

Мусаева Эльвира Яшаровна,
врач клинической лабораторной
диагностики лаборатории
трансплантационной иммунологии
и иммунотерапии гемобластозов
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: elvira.musaeva@dgoi.ru

© 2025 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 05.06.2025
Accepted 26.06.2025

Correspondence:

Elvira Ya. Musaeva,
MD in Clinical Laboratory Medicine
at the Laboratory of Transplantation
Immunology and Immunotherapy
of Hemoblastoses of the Dmitry Rogachev
National Medical Research Center of Pediatric
Hematology, Oncology and Immunology,
Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: elvira.musaeva@dgoi.ru

Т-линейный острый лимфобластный лейкоз (Т-ОЛЛ) составляет 10–15% всех случаев острых лимфобластных лейкозов у детей и характеризуется достаточно высокой частотой развития рефрактерного течения и рецидивов [1]. Результаты терапии при рефрактерном течении, даже при использовании

трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, остаются неудовлетворительными [2].

На текущий момент выбор препаратов с селективным действием в отношении T-клеточных предшественников для пациентов с рефрактерными формами или рецидивами T-ОЛЛ ограничен примене-

нием неларабина [3–5]. В то же время в терапии В-лимфоцитных лейкозов хорошо зарекомендовала себя CAR-T (chimeric antigen receptor) клеточная терапия, представляющая собой производство генно-модифицированных Т-лимфоцитов с цитотоксической активностью в отношении CD19 или других антигенов, специфичных для В-клеточной линии дифференцировки [6–10].

Одной из перспективных мишеней для таргетной иммунотерапии является поверхностный антиген CD5, широко экспрессируемый опухолевыми клетками при Т-ОЛЛ, однако использование его при разработке клеточной терапии сопряжено с рядом трудностей ввиду наличия экспрессии маркера на здоровых Т-лимфоцитах, тимоцитах, а также ряде В-клеток [11, 12]. В частности, потенциальными проблемами являются как аутоагрессия (так называемый фратрицид) в процессе производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов, так и элиминация нормальных клеток иммунной системы наравне с бластными у пациентов с Т-ОЛЛ при применении данной терапии [13].

В процессе производства CAR-T-лимфоцитов проблема фратрицида может быть решена несколькими путями: включением этапа генетического редактирования с использованием технологии CRISPR/Cas9, подразумевающего нокаут гена, кодирующего CD5, включением в конструкцию белкового модуля, опосредующего внутриклеточную деградацию либо блокирующего экспрессию белка CD5, а также культивированием в присутствии ингибиторов тирозинкиназы, снижающих эффекты фратрицида у трансдуцированных Т-лимфоцитов [14–16]. Однако использование данных методик может быть сопряжено со снижением показателей жизнеспособности и общей клеточности финального продукта, что может создавать трудности в достижении необходимых для клинического применения количественных показателей.

В настоящее время в литературе имеются данные об эффекте снижения экспрессии CD5 Т-лимфоцитами в случае трансдукции их анти-CD5 CAR-вектором. Данный биологический феномен позволяет производить анти-CD5 CAR-T-лимфоциты без дополнительных генетических модификаций, позволяя получить биомедицинский клеточный продукт (БМКП) с необходимыми клеточностью и фенотипом [17, 18].

Целью настоящей работы являлось проведение доклинических исследований для последующего формирования клинического протокола производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов в условиях НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Производство и характеристика вирусного вектора

Ретровирусный вектор MM25b, содержащий ген *CAR* и пакующий сигнал (ψ) вируса мышиного лейкоза Молони, был получен в дар от доктора М.А. Мамонкина (Baylor College of Medicine Houston, Техас, США). *CAR* содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент из моноклонального антитела H65 к CD5 [19], шарнирную область из человеческого иммуноглобулина G4, трансмембранный и внутриклеточный домены из человеческого CD28, сигнальный домен из человеческого CD3z.

Ретровирусный вектор был получен с использованием упаковочной клеточной линии 293Vec-Galv (Biovec pharma). Клеточную культуру культивировали на двухслойной клеточной фабрике (NEST) с использованием среды StemMacs (Miltenyi Biotec) при стандартных условиях (37°C, 5% CO₂). Конфлюэнтность монослоя (80 ± 5%) оценивали с помощью микроскопии. Трансфекцию осуществляли с использованием комплексов плазмидной ДНК с линейным PEI (PolyPlus) в соотношении 1:4 в бессывороточной среде Opti-MEM (Gibco). Через 24 ч проводили полную замену среды. Вирусосодержащий супернатант собирали через 48 ч после трансфекции, центрифугировали при 500g в течение 10 мин и пропускали через фильтр 0,45µm PES. Аликвоты вирусного вектора хранили при –80°C.

Для определения титра вирусный вектор обрабатывали бензоназой (DiaGene, Россия) в концентрации 50 Ед/мл. Вирусную РНК выделяли с помощью набора HiPure Viral RNA kit (Magen, Китай), затем обрабатывали ДНКазой (DNase I, New England Biolabs, Великобритания) и проводили обратную транскрипцию с использованием набора Реверта-Л (AmpliSens, Россия). Подсчет вирусных геномных копий выполняли методом цифровой капельной полимеразной цепной реакции (ПЦР) на системе QX200 ddPCR System (Bio-Rad Technologies, США) с применением специфических праймеров (F-5'-CTCCGATTGACTGAGTCGC-3'; R-5'-GAACAGCGAGACCACAAGT-3') и зонда (FAM-5'-ACCCGTGTATCCAATAAACCCCTCTTGC-3') к LTR-элементу ретровируса. Титр рассчитывали по формуле:

$$T = \frac{R \times C \times D \times 1000}{V},$$

где T – титр (геномные копии/мл); R – объем ПЦР (20 мкл); C – концентрация (копий/мкл); D – коэффициент разведения вируса; V – объем образца в реакции (8 мкл).

Процесс производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов

В день 0 осуществляли взятие периферической крови здорового донора в пробирки CPT (Becton

Dickinson, США) с последующим выделением мононуклеарных клеток согласно протоколу производителя. Фракции CD4⁺- и CD8⁺-клеток сортировали на приборе MACSQuant Tyto (Miltenyi Biotec) с использованием антител CD4-VioBlue human GMP (Miltenyi Biotec) и CD8-APC human GMP (Miltenyi Biotec). Из полученной фракции 5×10^6 клеток вносили в 6-луночный биореактор G-Rex (Wilson Wolf Manufacturing, 80240M) в среде TechMacs (Miltenyi Biotec), содержащей цитокины интерлейкин (IL)-7 и IL-15 (Miltenyi Biotec) в концентрации 12,5 нг/мл, активировали с помощью реагента TransAct (Miltenyi Biotec).

Через 24 ч к активированным Т-лимфоцитам добавляли ретровирусный анти-CD5-вектор и реагент Vectofusin-1 (Miltenyi Biotec) в концентрации 10 мкг/мл. Далее клетки культивировали в течение 13 дней с полной оценкой фенотипа и функциональной активности продукта на +9-й и +14-й дни. Доливку среды осуществляли на +3-й день, замену – на +7-й и +10-й дни.

Оценка клеточного состава, фенотипа и экспрессии CAR методом проточной цитометрии

Исследование экспрессии CD5 проводилось в дни 0, +7, +9 и +14 посредством инкубации клеточной суспензии с моноклональными антителами 7-AAD-PerCP (Beckman Coulter), CD3-APC (клон UCHT1, Invitrogen), CD5-PC7 (клон BL1a, Beckman Coulter). Оценивалось относительное количество CD5⁺-клеток в регионе 7AAD-CD3⁺-клеток.

В целях оценки фенотипа клеточного продукта клетки инкубировали с моноклональными антителами CD4-Pacific Blue (клон 13B8.2, Beckman Coulter), CD8-Pacific Orange (клон MEM-31, Exbio Diagnostics), CD279-FITC (клон EH12.2h7, Exbio Diagnostics), tigt-ECD (клон A15153G, BioLegend), 7-AAD-PerCP (Beckman Coulter), CD197-PC7 (клон REA108, Miltenyi Biotec), CD3-APC (клон UCHT1, Invitrogen), CD45RA-APC-A700 (клон 2H4, Beckman Coulter), CD57-APC-A750 (клон REA769, Miltenyi Biotec). Оценивали экспрессию маркеров истощения, а также следующие популяции Т-лимфоцитов: наивные (CD197⁺CD45RA⁺), центральные (CD197⁺CD45RA⁻), эффекторные (CD197⁻CD45RA⁻) и терминально дифференцированные (CD197⁻CD45RA⁺).

Уровень экспрессии CAR оценивался посредством инкубации клеток с реагентом CD5 CAR-detection FITC (Acro Biosystems), антителами CD45-VioBlue (клон 5B1, Miltenyi Biotec), CD4-VioGreen (клон REA623, Miltenyi Biotec), CD3-APC (клон UCHT1, Invitrogen), 7AAD-Per-CP (Beckman Coulter), CD8-APC-Vio770 (клон REA734, Miltenyi Biotec).

Образцы анализировали на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter), данные обрабатывали с помощью программы CytExpert 2.3.

Определение числа копий вектора

Для определения числа копий вектора (vector copy number, VCN) клеточный продукт обрабатывали бензоназой (DiaGene, Россия). ДНК выделяли набором ExtractDNA Blood & Cells (Евроген, Россия). Подсчет VCN выполняли методом цифровой капельной ПЦР на системе QX200 ddPCR System (Bio-Rad Technologies, США) с применением специфичных праймеров и зонда к LTR-элементу ретровируса и к референсному гену RPP30 (F-5'-GATTTGGACCTGCGAGCG-3'; R-5'-GCGGCTGTCTCCACAAGT-3'; HEX-5'-CTGACCTGAAGGCTCT-3'). VCN рассчитывали по формуле:

$$VCN = 2 \times \frac{\text{число копий } LTR}{\text{число копий } RPP30}$$

Функциональная оценка цитотоксичности, продукции цитокинов и дегрануляции

Для функциональной оценки полученных клеточных продуктов использовали CD5-экспрессирующие клеточные линии Jurkat и Jeko-1, в качестве отрицательного контроля – линию K562. В целях оценки цитотоксичности клеточные линии были трансдуцированы реагентом Incucyte Nuclight Red Lentivirus Reagent (EF1a, Puro, Essen BioScience) и селектированы в присутствии пуромидина в концентрации 1 мкг/мл.

Для проведения функциональных тестов из продукта производства в дни +9 и +14 отбирали 10 млн клеток, вносили в среду TechMacs (Miltenyi Biotec) при отсутствии цитокинов IL-7 и IL-15, инкубировали в течение суток в стандартных условиях.

Цитотоксичность оценивали посредством инкубации 3×10^4 клеток продукта производства с трансдуцированными клеточными линиями в соотношении 1:1 при 37°C и 5% CO₂. С помощью прибора для визуализации клеток Incucyte (Sartorius) фиксировали изображения клеток каждый час в течение 48 ч. Далее анализировали количество красных объектов в зависимости от времени инкубации, рассчитывали значения площади под кривой (Area Under the Curve, AUC).

Оценка дегрануляции и продукции цитокинов проводилась с клеточной линией Jurkat в соотношении 1:1. Для оценки секреции цитокинов дополнительно вносили ингибитор трансмембранного транспорта белков (GolgiPlug, BD) и инкубировали в течение 3 ч. В целях исследования дегрануляции клетки инкубировали с клеточной линией в присутствии антитела CD107a (клон H4A3, Elabscience) в течение 2 ч. Далее инкубировали с антителами к поверхностным маркерам CD5-Pacific Blue (клон BL1a, Beckman Coulter), CD4-Pacific Orange (клон MEM-241, Exbio Diagnostics), 7AAD-Per-CP (Beckman Coulter), CD3-APC (клон UCHT1, Invitrogen),

CD8-APC-Vio770 (клон SK1, Becton Dickinson). Для оценки дегрануляции дополнительно использовали антитело CD107a (клон H4A3, Elabscience). Продукция цитокинов оценивалась посредством внутриклеточного окрашивания с антителами IFN- γ -PE (клон REA600, Miltenyi Biotec), TNF- α -PE-Vio-770 (клон Mab11, Invitrogen) с использованием набора Fix&Perm (Abcam). Анализ образцов проводили на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter), оценивали количество фактор некроза опухоли и интерферон-продуцирующих клеток, а также CD107 α -экспрессирующих в регионе CD3⁺CD8⁺.

Для всех функциональных исследований параллельно с оценкой продукта производства были исследованы генетически немодифицированные Т-лимфоциты от идентичного донора (Mock-клетки). Эффект Mock-клеток вычитали из эффекта анти-CD5 CAR-Т-лимфоцитов. В целях сопоставимости результатов между собой все функциональные исследования проводились с пересчетом на процент CAR-экспрессирующих Т-клеток.

Оценка эффективности элиминации CD5⁺-клеточной линии *in vivo*

Для эксперимента использовали самок мышей линии NCG (NOD.Cg-Prkdcscid112rgem1Smoc) в возрасте 6–8 недель, содержащихся в стандартных условиях питомника лабораторных животных «Пушино» (уникальная научная установка «Био-модель» ИБХ РАН; Биоресурсная коллекция лабораторных грызунов SPF-категории для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований, при поддержке Министерства науки и высшего образования (075-15-2025-486)). Экспериментальные процедуры проводились в соответствии с рекомендациями по уходу за лабораторными животными.

Опухолевые клетки Jurkat модифицировали методом лентивирусной трансдукции для стабильной экспрессии ffluc (firefly luciferase, люцифераза светлячка). Далее клетки вводили в хвостовую вену в дозе по $2,5 \times 10^6$ на мышь. На 5-й день, по итогам визуализации опухолей, мышей разделяли на 3 экспериментальные группы и вводили в хвостовую вену эффекторные клетки. Первая группа получала терапию контрольными Т-клетками (Mock-T; $n = 5$), вторая и третья группы – анти-CD5 CAR-Т-клетками по $2,5 \times 10^6$ ($n = 7$) и 5×10^6 ($n = 7$) на мышь соответственно.

Для визуализации опухоли субстрат D-люциферин (GoldBio) еженедельно вводили интраперитонеально в концентрации 15 мг/мл. До и после введения субстрата мышей помещали в камеру для наркоза изофлураном в концентрации 1,5–2,5% в течение 5 мин. Через 10 мин после введения

D-люциферина проводили детекцию люминесценции в системе IVIS Lumina III (PerkinElmer, США).

Для оценки персистенции CAR-Т-лимфоцитов в периферической крови мышей со дня введения клеточного продукта еженедельно осуществляли забор крови из ретроорбитального синуса.

На 26-й день от введения опухолевых клеток по одной мышью из каждой группы были забраны для проведения гистологического исследования тканей селезенки, легкого и печени.

Оценка персистенции анти-CD5 CAR-Т-лимфоцитов в образцах крови мышей

Образцы крови мышей инкубировали с реагентом CD5 CAR-detection (Acro Biosystems), антителами anti-Mouse CD45-PE (клон REA599, Sony Biotechnology), 7-AAD-PerCP (Beckman Coulter), CD5-PC7 (клон BL1a, Beckman Coulter), CD3-APC (клон UCHT1, Invitrogen), CD8-APC-Vio770 (клон SK1, Becton Dickinson), CD45-VioBlue (клон 5B1, Miltenyi Biotec), CD4-Pacific Orange (клон MEM-241, Exbio Diagnostics). Далее лизировали с помощью раствора ExCellLyse (Exbio). Каждый образец сопровождался пробиркой негативного контроля, в которую реагент CAR-detection не добавлялся. Анализ образцов проводили на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter), оценивали абсолютное количество человеческих CD3⁺-клеток и относительное число CD3⁺CAR⁺ Т-лимфоцитов.

Гистологическое исследование

Аутопсийный материал от лабораторных мышей помещался в 10% нейтральный забуференный раствор формалина на 24 ч. Далее ткани помещались в гистологические кассеты. Гистологическая заливка осуществлялась с помощью станции HistoStar (Thermo Fisher Scientific, США). Для гистологической проводки материала использовались аппараты Sakura Tissue-Tek VIP 5 и Sakura Tissue-Tek Xpress X120. Изготовление срезов осуществлялось с использованием микротомы Thermo Fisher Scientific Microm HM 355S.

С помощью иммуногистохимического метода исследования на срезах с парафиновых блоков образцов ткани определялось наличие экспрессии CD3 (Cell Marque, клон MRQ-39), CD5 (Cell Marque, клон SP19) с применением набора ultraView Universal DAB Detection Kit, VENTANA. Для проведения исследования использовалась система Ventana Bench-Mark Ultra с последующим докрасиванием гематоксилином и автоматическим накрыванием покровными стеклами с помощью системы Dako CoverStainer. Готовые препараты оценивались методом световой микроскопии.

Статистическая обработка

Для статистической обработки результатов исследования использовали программу GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США). Для всех показателей данные представлены в виде медианы и разброса. Уровень статистической значимости описывался как *, **, *** и **** для значений $p < 0,05$, $< 0,01$, $< 0,001$ и $< 0,0001$ соответственно. Для сравнения двух выборок применяли парный t-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами были проведены 5 процессов производства анти-CD5 CAR-T-БМКП с помощью неавтоматизированной платформы G-Rex.

В целях исследования эффекта снижения экспрессии маркера CD5 в процессе производства CAR-T-лимфоцитов нами проводилась оценка его экспрессии в дни 0, +7, +9 и +14. При оценке продукта сортировки в день 0 наблюдалась тотальная экспрессия CD5 полученными клетками. При оценке данного маркера на +7-е сутки отмечалось снижение экспрессии до медианного значения 4,1% (разброс 0–7%) с ее полным отсутствием к 9-му дню (рисунок 1).

В целях определения оптимальной длительности процесса производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов полная оценка состава и функциональных свойств каждого продукта проводилась в дни +9 и +14.

Все 5 процессов демонстрировали удовлетворительную динамику экспансии общего количества CD3⁺-клеток со значимым приростом к +14-му дню. В день +9 кратность экспансии составляла $\times 18,4$ с медианой количества Т-лимфоцитов $92 (70–104) \times 10^6$. В день +14 общее количество Т-лимфоцитов возросло в 47,6 раза с медианой $238 (192–271) \times 10^6$

(рисунок 2А). Экспрессия CAR была высокой как в день +9, так и в день +14 с медианой 88% (69–97%) и 92% (75–96%) соответственно, что демонстрировало статистически незначимую разницу (рисунок 2Б). Таким образом, к +14-му дню возможно получение значимо большего количества Т-лимфоцитов без потери доли CAR-экспрессирующих клеток. Медиана VCN полученных клеточных продуктов составляла 2,81 (2,72–5,6).

При оценке фенотипа Т-лимфоцитов в продукте производства отмечалось преобладание популяции CD197-CD45RA⁻ (Tem) (рисунок 3). Медиана их доли среди CD4⁺-клеток составила 89,3% (82,4–92,6%) на +9-й день и 98,2% (94–99,1%) на +14-й день. Среди CD8⁺-клеток – 79% (70,8–84,7%) и 97,4% (96–99,3%) соответственно. К +14-му дню отмечался статистически значимый их прирост ($p < 0,01$). Соотношение CD4:CD8 составляло 1,6 (1,4–2,5) на +9-й день и 1 (0,9–2,4) на +14-й день.

При этом экспрессия маркеров истощения значимо не менялась в зависимости от длительности процесса производства (рисунок 4). К +14-му дню экспрессия CD57 демонстрировала достаточно низкие значения: 0,9% (0,3–3,4%) среди CD4⁺-клеток и 3,6% (2,4–8,3%) среди CD8⁺-клеток. Маркер CD279 к +14-му дню экспрессировался на 11% (9,9–14%) CD4⁺ и 3,7% (2,2–4,1%) CD8⁺ Т-лимфоцитов. Аналогичным образом экспрессия TIGIT составляла 7% (5,2–12,3%) и 12,5% (8,1–16,8%) соответственно.

Инкубация полученных CAR-T-лимфоцитов с CD5-экспрессирующей клеточной линией демонстрировала высокие показатели дегрануляции и экспрессии цитокинов (рисунок 5). Медиана экспрессии CD107a цитотоксическими Т-лимфоцитами при оценке на +9-й день составила 50% (26–68%), на +14-й день – 63% (38–74%) ($p < 0,01$).

Рисунок 1

Дот-плоты, отражающие кинетику процесса снижения экспрессии CD5

Figure 1

Dot-plots reflecting the kinetics of CD5 down-regulation

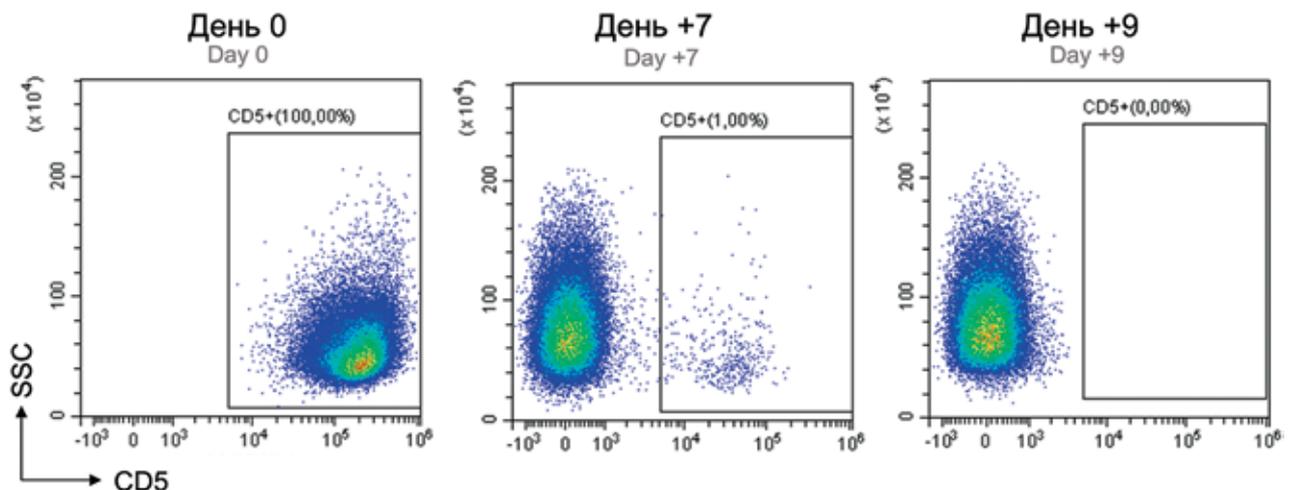


Рисунок 2

А – динамика темпов экспансии анти-CD5 CAR-T-клеточных продуктов в течение 14-дневного цикла культивации; Б – доля CAR-экспрессирующих Т-лимфоцитов в продукте производства
На графике представлены индивидуальные значения с указанием медианы в дни +9 и +14 и статистической значимости разницы между показателями

Figure 2

А – the changes in the expansion of anti-CD5 CAR-T cell products during a 14-day cultivation process; B – the percentage of CAR-positive T-cells in the product

The graph shows individual values with a median on days +9 and +14 and statistical significance between the values

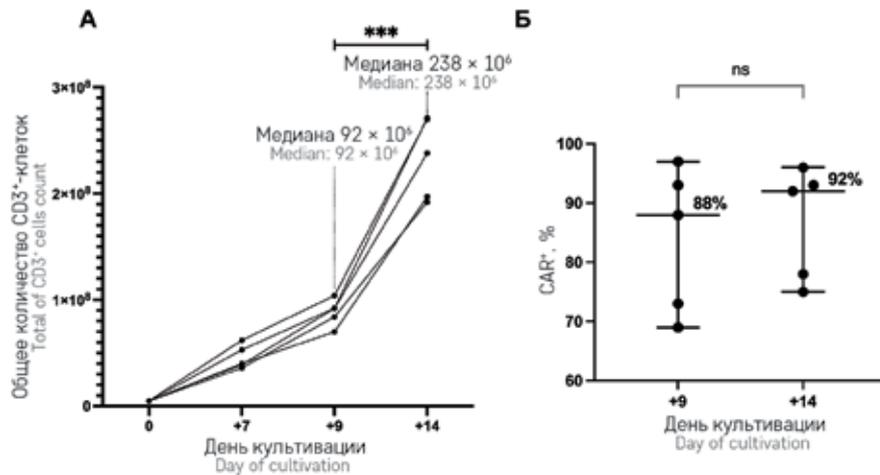


Рисунок 3

Фенотип CAR-T-лимфоцитов в зависимости от длительности процесса производства

А – индивидуальные значения с указанием медианы и статистической значимости; Б – дот-плоты, отражающие экспрессию CD197 и CD45RA CD4⁺- и CD8⁺-клетками на +9-й день

Figure 3

The phenotype of CAR-T lymphocytes depending on the duration of cultivation

А – individual values with a median and statistical significance; Б – Dot-plots representing CD197 and CD45RA expression by CD4⁺ and CD8⁺ cells on day +9

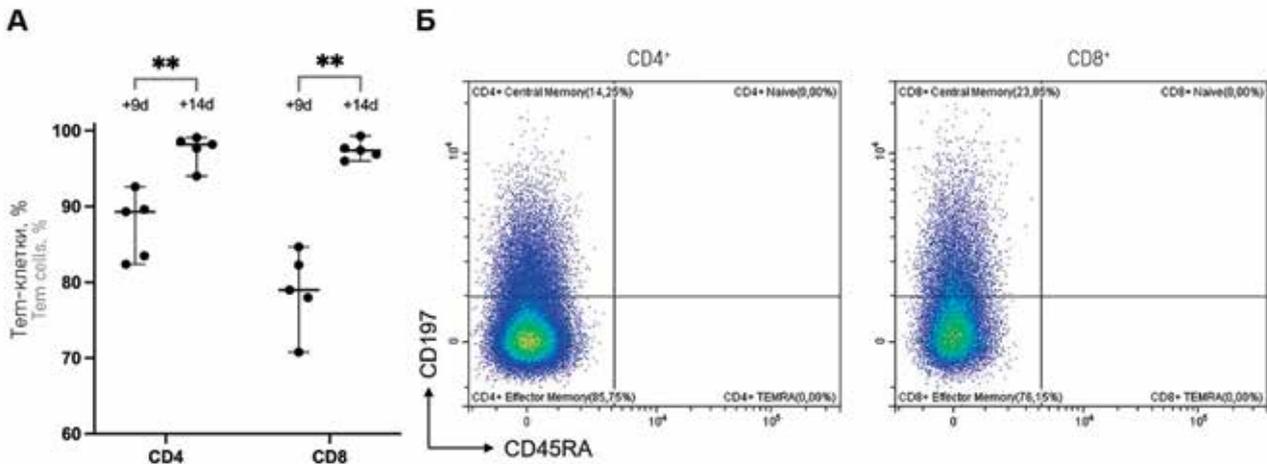
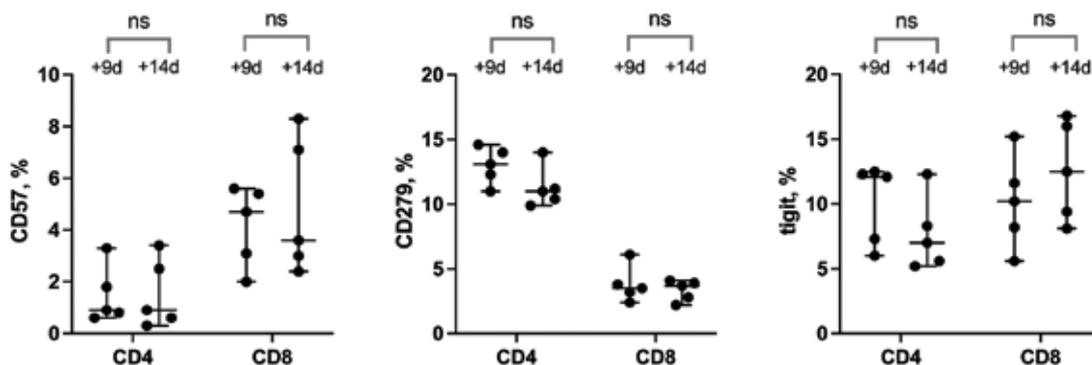


Рисунок 4

Оценка экспрессии маркеров истощения

Figure 4

The assessment of the expression of T cell exhaustion markers



Продукция фактора некроза опухоли также статистически значимо увеличивалась с 42% (12,2–68,3%) до 48% (14–73,9%) ($p < 0,01$). Экспрессия интерферона- γ значимо не изменялась.

Оценка цитотоксичности анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов проводилась в отношении клеточной линии Jurkat, которая служила моделью CD5⁺ T-лимфоцитарного лейкоза. Дополнительно цитотоксичность оценивали в отношении CD5⁺ B-клеточной линии Jeko-1. В качестве отрицательного контроля использовали линию K562, не имеющую на своей поверхности маркера CD5. Оценка цитотоксичности в системе визуализации IncuCyte показала успешную элиминацию CD5⁺-линий в течение 48 ч. CD5-негативная линия не была элиминирована, отмечалось нарастание количества клеток, схожее по темпам с эффектом Моск-клеток (рисунки 6А).

Для всех 5 процессов производства исследование специфичной цитотоксичности в отношении линии Jurkat проводилось в дни +9 и +14 в соотношениях эффекторных клеток к таргетным 1:1 и 0,5:1. Во всех случаях также наблюдалась успешная элиминация опухолевых клеток (рисунки 6Б, В). Эффект оценивали путем расчета разницы в значениях AUC, полученных при исследовании Моск-T-клеток и CAR-T-лимфоцитов от идентичных доноров. Статистически значимых различий в показателях в зависимости от длительности культивации получено не было.

В целях оценки эффективности элиминации CD5⁺ T-клеточного лейкоза *in vivo* нами был проведен эксперимент на мышинной модели с использованием клеточной линии Jurkat-ffluc. Учитывая более высокие показатели кратности экспансии и экспрессии CAR-рецептора при длительности процесса 14 дней, данный протокол был выбран

для производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов для оценки эффективности на мышинной модели.

В полученном продукте, аналогично с полученными ранее данными, доля CAR-экспрессирующих клеток была достаточно высокой и составляла 91%. Дозу клеточного продукта на мышь рассчитывали с пересчетом на долю CAR-экспрессирующих клеток (таблица).

На 4-й день от введения клеток Jurkat-ffluc опухоль визуализировалась у всех 19 экспериментальных мышей (рисунки 7А). На 5-й день животным вводились эффекторные клетки в соответствии с распределением на группы. Наиболее высокие уровни люминесценции при последующем наблюдении отмечались в контрольной группе, получившей Моск-T-клетки, что выражалось в более низких показателях выживаемости (рисунки 7Б, В). В группах мышей, получивших CAR-T-клетки в различных дозах, прогрессия опухолевого роста была менее выражена. Однако было отмечено, что доза 5 млн CAR-T-клеток более эффективно сдерживает опухолевый рост, что также подтверждается при анализе кривых выживаемости: наблюдается статистически значимая разница между группами с дозами 2,5 млн и 5 млн CAR-T-клеток на мышь ($p < 0,01$). При длительности наблюдения 61 день в группе мышей, получившей большую дозу CAR-T-клеток, прогрессия опухоли наблюдалась лишь у одной мыши, в то время как в группе, получившей дозу 2,5 млн, за время наблюдения полного сдерживания опухолевого роста ни у одной мыши достигнуто не было.

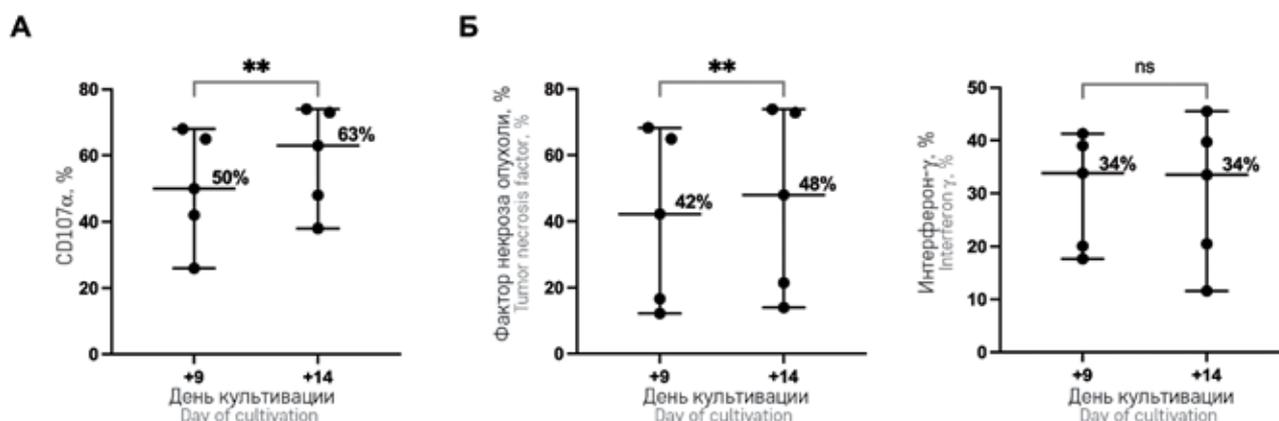
Помимо визуализации опухоли в каждую точку наблюдения проводился забор периферической крови мышей в целях оценки персистенции человеческих T-лимфоцитов и доли CAR-экспрессирующих клеток. За время наблюдения человеческие T-лим-

Рисунок 5

Функциональная оценка продукта производства на +9-й и +14-й дни: оценка дегрануляции (А) и секреции (Б) цитокинов цитотоксическими T-лимфоцитами после инкубации с CD5-экспрессирующей клеточной линией Jurkat

Figure 5

Functional assay of CAR-T cells on +9 and +14 days of cultivation: degranulation assay (A) and cytokines production (B) by CD8⁺ T-cells after coculture with CD5-expressing Jurkat cell line



фоциты детектировались у всех экспериментальных животных. Наиболее активная пролиферация отмечалась в группах мышей, получивших Mock-T-клетки и CAR-T-лимфоциты в дозе 5 млн клеток на мышью, что, вероятно, связано с изначальной инфузией большего количества клеток.

У мышей, получивших CAR-T, во все точки наблюдения детектировались CAR⁺-клетки (рисунки 8). Наиболее длительная персистенция (весь период наблюдения) отмечалась у мышей, получивших дозу 5 млн CAR-T на мышью.

По данным иммуногистохимического исследования, проведенного на 26-й день от введения опухолевых клеток, в тканях животных, получивших Mock-T-клетки, отмечалась выраженная инфильтрация человеческими CD3⁺ и CD5⁺ Т-лимфоцитами.

В то же время в группах мышей, получивших CAR-T-клетки, данная инфильтрация практически отсутствовала (рисунки 9).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка новых подходов к терапии Т-линейных лейкозов, в частности в области клеточных технологий, на текущий момент остается актуальной задачей [20–22].

Учитывая успехи CAR-T-клеточной терапии в лечении пациентов с В-линейным острым лимфобластным лейкозом, большой интерес представляет ее использование в контексте Т-линейных лейкозов. Однако экспрессия опухолевыми клетками при Т-ОЛЛ большинства маркеров зрелых Т-лимфоцитов создает

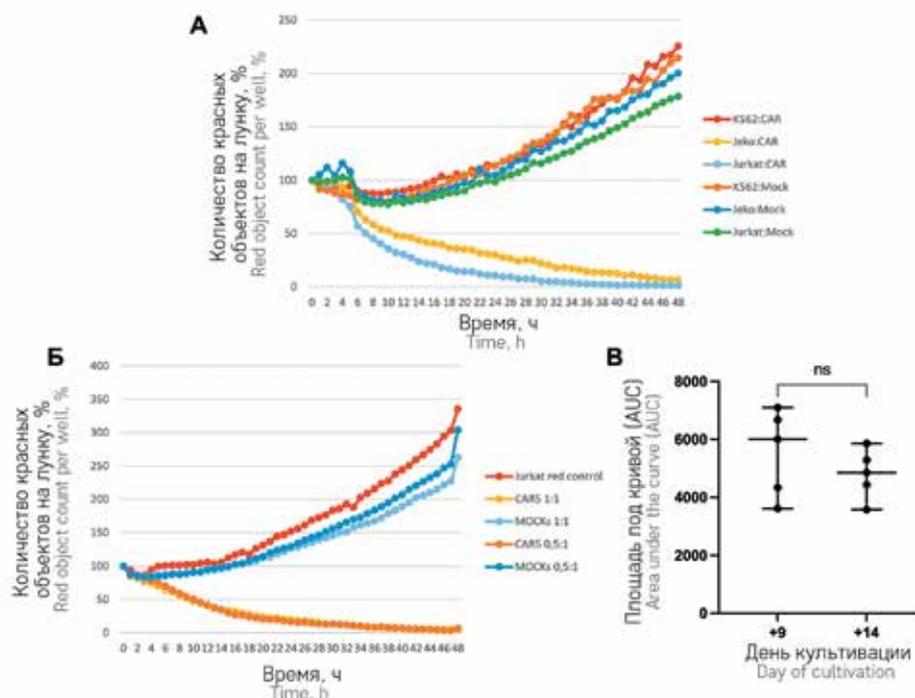
Рисунок 6

Оценка цитотоксичности анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов на +14-й день культивации: А – в отношении CD5-экспрессирующих линий Jurkat и Jeko-1 и клеточной линии K562 (отрицательный контроль); Б – в отношении клеточной линии Jurkat в различных соотношениях эффекторных клеток к целевым (1:1 и 0,5:1); В – суммарные данные полученных значений AUC, рассчитанных как разница между AUC лунок Mock-T:Jurkat и CAR-T:Jurkat в соотношении 1:1

Данные представлены в виде индивидуальных значений с указанием медианы, разброса и статистической значимости

Figure 6

A – cytotoxicity assay of anti-CD5 CAR-T lymphocytes after coculture with CD5-expressing Jurkat and Jeko-1 cell lines and K562 cell line (negative control) on day +14 of cultivation; Б – cytotoxicity assay with the Jurkat cell line with different effector:target ratios (1:1 and 0.5:1) on day +14 of cultivation; В – the comprehensive data on the total area under the curve (AUC) values calculated as the difference between the AUC values for Mock-T:Jurkat and CAR-T:Jurkat wells at a 1:1 ratio. The data is shown as individual values with a median, range, and statistical significance.



Таблица

Характеристика экспериментальных групп мышей

Table

Characteristics of the experimental cohorts of mice

Группа Group	Доза CAR ⁺ -клеток на мышью, ×10 ⁶ The dosage of CAR ⁺ cells per mouse, ×10 ⁶	Общее количество CD3 ⁺ -клеток на мышью, ×10 ⁶ Total CD3 ⁺ cell count per mouse, ×10 ⁶
Mock-T		5,5
CAR-T 1:1	2,5	2,7
CAR-T 2:1	5	5,5

Рисунок 7

А – визуализация опухоли посредством детекции люминесценции в 3 экспериментальных группах мышей (Mock-T, $2,5 \times 10^6$ и 5×10^6 CAR-T на мышь) в зависимости от времени введения опухолевых (Jurkat-ffluc) клеток. Звездочкой обозначены мыши, взятые для проведения гистологического исследования на 26-е сутки; Б – динамика изменения люминесценции в среднем по 3 группам; В – сравнительный анализ выживаемости мышей в соответствии с экспериментальной группой с указанием статистических различий

Figure 7

А – tumor burden assessment by luminescence detection in 3 experimental cohorts of mice (Mock T, $2,5 \times 10^6$ and 5×10^6 CAR-T per mouse) depending on the time post tumor cell (Jurkat-ffluc) infusion. The stars indicate the mice, taken for histological assessment on day 26; Б – the average changes in luminescence in three groups; В – a comparative survival analysis of the mice in accordance with the experimental group, the statistical significance is indicated

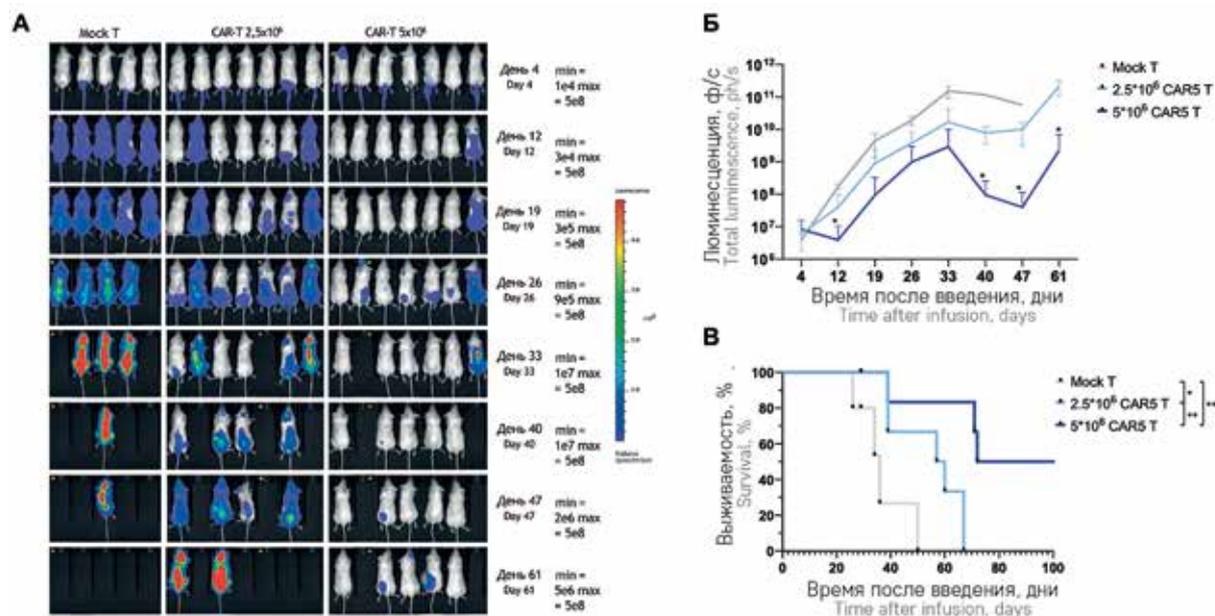
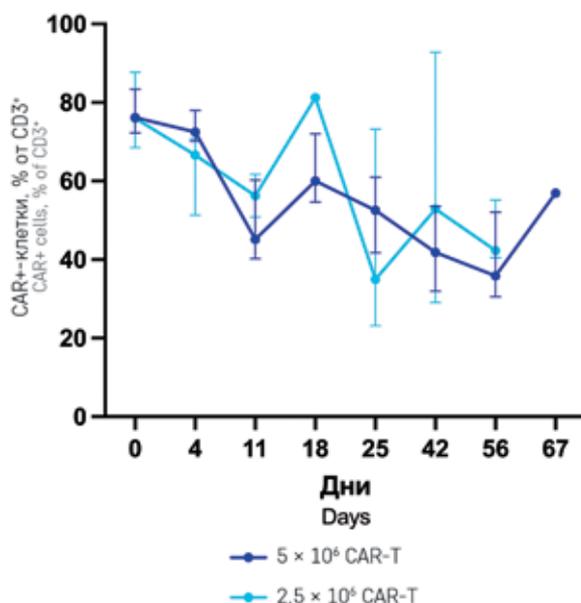


Рисунок 8

Персистенция CAR-экспрессирующих клеток в периферической крови мышей
День 0 – дата введения эффекторных клеток. Данные представлены в виде медианы с указанием разброса

Figure 8

Human CAR+ cell persistence in the peripheral blood of the mice
Day 0 – day of effector cell infusion. The data is shown as a median with a range



трудности в производстве CAR-T-лимфоцитов, в частности ввиду потенциального фратрицида в процессе производства [13].

Данные литературы свидетельствуют о том, что экспрессия CAR к Т-клеточным маркерам способна приводить к интернализации соответствующих белков. Так, например, данный феномен описан при таргетировании широко экспрессируемых Т-лимфоцитами CD5 и CD7. Однако данный процесс не всегда может быть достаточным для обеспечения устойчивости к аутоагрессии [23, 24]. В случае с CD5 экспрессия CAR приводит к интернализации и полной деградации данного маркера, что создает условия для экспансии CAR-T-клеток в отсутствие выраженных эффектов фратрицида [24]. В связи с этим данный маркер является выгодной мишенью для таргетирования при разработке клеточной терапии для пациентов с Т-лимфоцитарными лейкозами.

В настоящей работе была оптимизирована методика производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов в условиях естественного снижения экспрессии поверхностного маркера CD5 трансдуцированными Т-клетками.

По данным литературы, период фратрицида CAR-T-лимфоцитами в случае снижения экспрессии CD5 не является длительным ввиду его быстрой интернализации [25]. Результаты

Рисунок 9

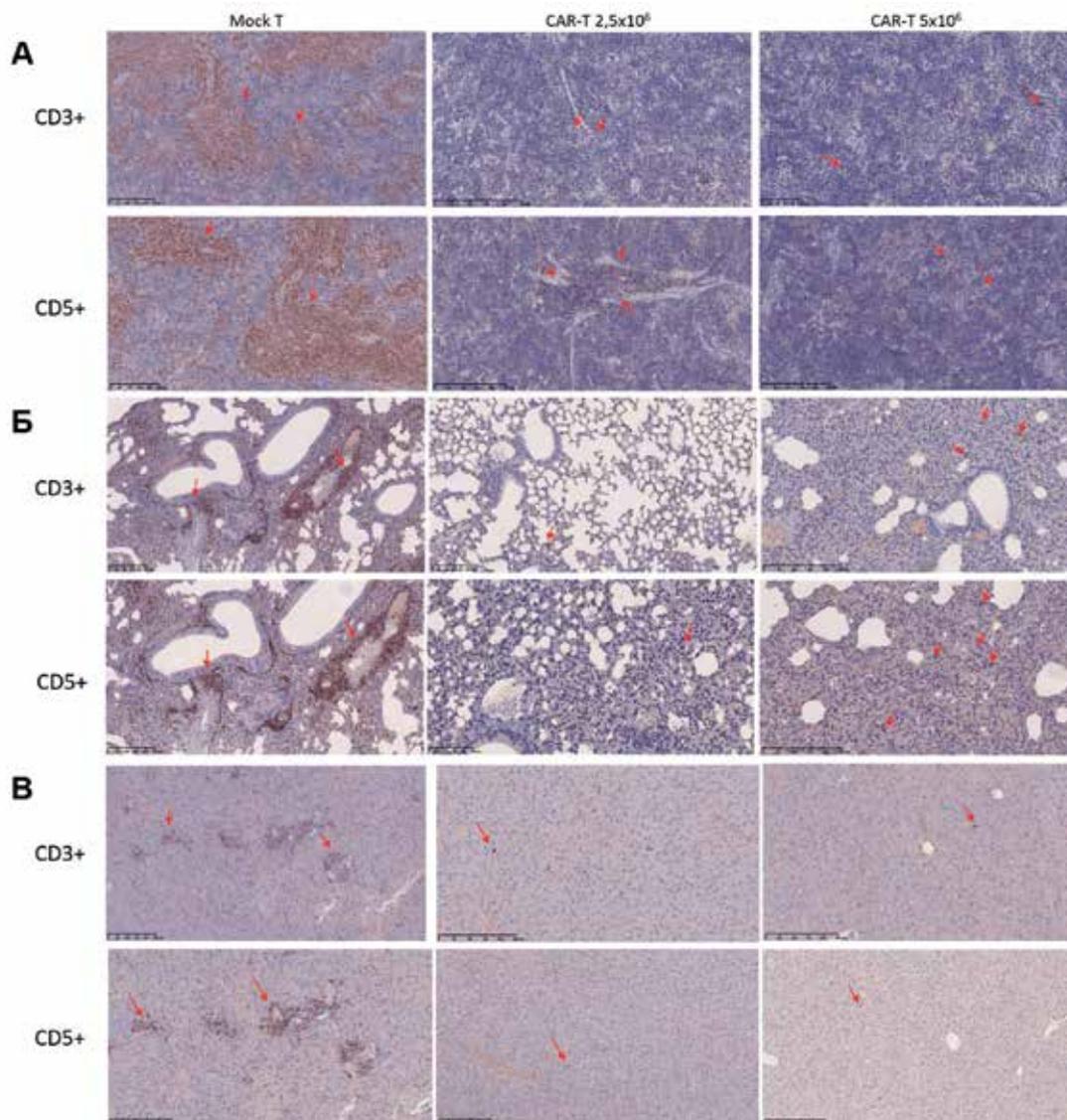
Иммуногистохимическое окрашивание тканей селезенки (А), легкого (Б) и печени (В) мышей на маркеры CD3 (верхний ряд) и CD5 (нижний ряд)

Стрелками обозначены участки инфильтрации CD3⁺- и CD5⁺-клетками

Figure 9

Immunohistochemical staining of the spleen (A), lung (B), and liver (B) of the mice for CD3 (top row) and CD5 (bottom row) markers

The arrows indicate the sites of infiltration by CD3⁺ and CD5⁺ cells



нашего исследования также подтверждают данное наблюдение: во всех проведенных процессах производства наблюдались удовлетворительные показатели кратности экспансии со значительным приростом абсолютного количества Т-клеток к +14-му дню и выраженным снижением экспрессии CD5 к +7-му дню.

Эффективность элиминации опухолевых клеток CAR-T-лимфоцитами определяется способностью полученных клеток к пролиферации и персистенции *in vivo*, что напрямую зависит от их фенотипа. CAR-T-лимфоциты с фенотипом центральных Т-клеток памяти обладают более высоким пролиферативным потенциалом и могут обеспечивать более длительную персистенцию [26]. В случае генерации

CAR-T-клеток в условиях фратрицида дополнительная активация Т-клеток в процессе производства приводит к формированию более истощенного фенотипа финального продукта [17, 25]. В соответствии с этим полученные нами данные демонстрируют преобладание популяции Тем (CD197⁺CD45RA⁻) во всех полученных продуктах. Однако оценка экспрессии таких маркеров истощения, как CD279 (PD-1), CD57 и TIGIT, демонстрирует значения, сравнимые с таковыми у CAR-T-лимфоцитов, полученных в отсутствие фратрицида [27].

Помимо эффекта аутоагрессии формирование более эффекторного фенотипа может зависеть от ко-стимулирующего домена, используемого в конструкторе химерного рецептора. Так, например

М.А. Мамонкин и соавт. исследовали возможность производства анти-CD5 CAR-T-клеток с ко-стимулирующими доменами из суперсемейства TNFR. Использование данных доменов сопровождалось формированием CAR-T-клеточного продукта с более «молодым» фенотипом центральных клеток памяти. Однако эффекты аутоагрессии в связи с усилением ими экспрессии молекул клеточной адгезии ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1) значительно увеличивались, что было связано с более активным формированием иммунологических синапсов. Использование ко-стимулирующего домена CD28 в данном исследовании приводило к формированию более эффекторного фенотипа, но при этом снижало эффекты аутоагрессии, позволяя получить клеточный продукт с удовлетворительными показателями кратности экспансии и функциональными свойствами, что также подтверждается результатами нашего исследования [25].

При исследовании функциональной активности полученных CAR-T-лимфоцитов были отмечены высокие значения дегрануляции и синтеза таких цитокинов, как фактор некроза опухоли и интерферон- γ . Оценка цитотоксичности также продемонстрировала успешную элиминацию CD5-экспрессирующих клеточных линий Jurkat и Jeko-1.

Нами было проведено исследование элиминации CD5⁺ T-линейного лейкоза на мышинной модели. Введение 2,5 млн опухолевых клеток приводило к визуализации опухолевых клеток посредством детекции люминесценции у всех экспериментальных мышей. Последующая терапия мышей анти-CD5 CAR-T-лимфоцитами демонстрировала их способность элиминировать опухолевые клетки и способствовала лучшей выживаемости лабораторных животных.

При исследовании доз CAR-T-клеток в объеме 2,5 и 5 млн на мышь, бóльшая доза демонстрировала лучшие показатели сдерживания опухолевого роста и общей выживаемости. В данной группе также наблюдалась длительная персистенция человеческих CAR-T-клеток. При проведении иммуногистохимического исследования тканей животных наблюдалась более выраженная инфильтрация CD3⁺- и CD5⁺-клетками в контрольной группе. Сопоставление этих данных с результатами детекции люминесценции позволяет предположить опухолевую природу данной инфильтрации. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об эффективности проводимой терапии и демонстрируют длительную персистенцию CAR-T-клеток, несмотря на их более эффекторный фенотип.

В целях определения оптимальной длительности процесса производства все полученные клеточные

продукты были оценены на +9-й и +14-й дни. Более длительная культивация CAR-T-клеток приводила к значимому увеличению кратности экспансии, доля CAR-экспрессирующих клеток при этом не сокращалась, полученные показатели VCN были сопоставимы с данными литературы [18]. Фенотип T-лимфоцитов отмечался более выраженным преобладанием популяции Tem без увеличения уровней экспрессии маркеров истощения и без потери функциональной активности в отношении клеточной линии Jurkat. Исследование более длительного протокола производства на мышинной модели также показало достаточно длительную персистенцию CAR-T-клеток. Таким образом, при разработке клинического протокола производства может быть использована как 9-, так и 14-дневная длительность культивации без значимого влияния на качество конечного клеточного продукта. Количественные показатели при этом будут определяться условиями клинического протокола.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анти-CD5 CAR-T-лимфоциты представляют собой перспективный подход в терапии пациентов с T-ОЛЛ, сопровождающимся экспрессией маркера CD5. В настоящем исследовании нами был разработан и оптимизирован лабораторный протокол производства анти-CD5 CAR-T-лимфоцитов, показана их эффективность как *in vitro*, так и *in vivo* на мышинной модели. Полученные данные могут быть использованы для последующей разработки клинического протокола производства БМКП.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках государственного задания, регистрационный номер НИОКТР 1023022700111-4 «Разработка высокотехнологического лекарственного препарата для лечения острых T-лимфобластных лейкозов у детей на основе технологии CAR-T и CAR-NK», работа Волкова Д.В. проведена при поддержке гранта Российского научного фонда №25-74-30002.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Musaeva E.Ya. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0581-9472>
Malakhova E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7334-0706>
Vedmedskaia V.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7247-4844>
Dudorova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9444-4689>
Osipova D.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9968-9332>
Volkov D.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1800-999X>
Chernov A.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5371-1656>
Fedorova A.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4699-1730>
Fadeeva M.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6553-2505>
Lodoeva O.B. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2874-0014>
Kulakovskaya E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9639-2779>
Sozonova T.A. ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-0057-2727>
Stepanov A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1616-4408>
Pershin D.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6148-7209>
Maschan M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1735-0093>

Литература / References

1. Шарапова Г.Р., Румянцева Ю.В., Бойченко Э.Г., Лагойко С.Н., Быданов О.И., Алейникова О.В. и др. Терапия Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза у детей: опыт российско-белорусской кооперированной группы. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2015; 14 (1): 26–37. DOI: 10.24287/1726-1708-2015-14-1-26-37 [Sharapova G.R., Romyantseva Yu.V., Boichenko E.G., Lagoi-ko S.N., Bydanov O.I., Aleinikova O.V., et al. Therapy of childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: Experience gained by the Russian-Byelorusian cooperative group. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2015; 14 (1): 26–37. (In Russ.)].
2. Климентова М.А., Шелихова Л.Н., Илюшина М.А., Благов С.Л., Перминова М.Е., Попов А.М., и др. Результаты применения венето-клакса, даратумумаба и плериксафора в составе кондиционирования при химиорефрактерных формах острых лейкозов у детей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2023; 22 (3): 14–27. DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-14-27 [Klimentova M.A., Shelikhova L.N., Ilushina M.A., Blagov S.L., Perminova M.E., Popov A.M., et al. The results of therapy with venetoclax, daratumumab and plerixafor as part of the conditioning regimen in chemotherapy-refractory acute leukemia in children. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2023; 22 (3): 14–27. (In Russ.)].
3. Dunsmore K.P., Winter S.S., Devidas M., Wood B.L., Esiashvili N., Chen Z., et al. Children's Oncology Group AALL0434: A Phase III Randomized Clinical Trial Testing Nelarabine in Newly Diagnosed T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *JCO* 2020; 38: 3282–93. DOI: 10.1200/JCO.20.00256
4. Дьяконова Ю.Ю., Мякова Н.В., Литвинов Д.В., Шелихова Л.Н., Масчан М.А., Аbugова Ю.Г. и др. Первые результаты исследования терапии рецидивов высокой группы риска у детей по пилотному протоколу ALL-REZ-2016. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2019; 18 (1): 12–21. DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-1-12-21 [Dyakonova Yu.Yu., Myakova N.V., Litvinov D.V., Shelikhova L.N., Maschan M.A., Abugova Yu.G., et al. First results of pilot protocol ALL-REZ-2016 for children with high risk groups of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2019; 18 (1):12–21. (In Russ.)].
5. Дьяконова Ю.Ю., Быданов О.И., Попов А.М., Ольшанская Ю.В., Бойченко Э.Г., Алейникова О.В. и др. Роль неларабина в лечении Т-клеточной острой лимфобластной лейкемии: обзор литературы и результаты собственных исследований. *Терапевтический архив* 2018; 90: 37–50. DOI: 10.26442/terarkh201890738-50. [Dyakonova Yu.Yu., Bydanov O.I., Popov A.M., Olshanskaya Yu.V., Boichenko E.G., Aleinikova O.V., et al. The role of nelarabine in the treatment of T-cell acute lymphoblastic leukemia: literature review and own experience. *Therapeutic Archive* 2018; 90: 37–50. (In Russ.)].
6. Shah N.N., Lee D.W., Yates B., Yuan C.M., Shalabi H., Martin S., et al. Long-term follow-up of CD19-CAR T-cell therapy in children and young adults With B-ALL. *J Clin Oncol* 2021; 39 (15): 1650–9. DOI: 10.1200/JCO.20.02262
7. Молостова О.О., Шелихова Л.Н., Першин Д.Е., Попов А.М., Дубровина М.Е., Климентова М.А. и др. ЦНС-рецидив В-лимфобластной лимфомы после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток: терапия донорскими CD19-специфичными CAR-T-лимфоцитами. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2021; 20: 143–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-2-143-147 [Molostova O.O., Shelikhova L.N., Pershin D.E., Popov A.M., Dubrovina M.E., Klimentova M.A., et al. CNS relapse of B-lymphoblastic lymphoma after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: therapy with donor CD19-specific CAR-T cells. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2021; 20: 143–7. (In Russ.)].
8. Литвинов Д.В., Тесаков И.П., Шелихова Л.Н., Хачатрян Л.А., Зеркаленкова Е.А., Ольшанская Ю.В. и др. Острый лимфобластный лейкоз с транслокацией t(17;19): надежда появилась! Описание случая мультимодальной иммунотерапии у ребенка 3 лет с рефрактерным течением заболевания. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2022; 21 (3): 100–114. DOI: 10.24287/1726-1708-2022-21-3-100-114 [Litvinov D.V., Tesakov I.P., Shelikhova L.N., Khachatryan L.A., Zerkalenkova E.A., Olshanskaya Yu.V., et al. Acute lymphoblastic leukemia with the t(17;19) translocation: hope has appeared! Multimodal immunotherapy in a 3-year-old child with refractory disease: a case report. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2022; 21 (3): 100–114. (In Russ.)].
9. Schultz L.M., Jeyakumar N., Kramer A.M., Sahaf B., Srinagesh H., Shiraz P., et al. CD22 CAR T cells demonstrate high response rates and safety in pediatric and adult B-ALL: Phase 1b results. *Leukemia* 2024; 38: 963–8. DOI: 10.1038/s41375-024-02220-y
10. Maschan M., Caimi P.F., Reese-Koc J., Sanchez G.P., Sharma A.A., Molostova O., et al. Multiple site place-of-care manufactured anti-CD19 CAR-T cells induce high remission rates in B-cell malignancy patients. *Nat Commun* 2021; 12: 7200. DOI: 10.1038/s41467-021-27312-6
11. Semchenkova A., Mikhailova E., Demina I., Roumiantseva J., Karachunskiy A., Novichkova G., et al. Analysis of antigen expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia by multicolor flow cytometry: implications for the detection of measurable residual disease. *IJMS* 2025; 26: 2002. DOI: 10.3390/ijms26052002
12. Burgueño-Bucio E., Mier-Aguilar C.A., Soldevila G. The multiple faces of

- CD5. *J Leuk Biol* 2019; 105: 891–904. DOI: 10.1002/JLB.MR0618-226R
13. Lambie A.J., Gardner R. CAR T cells for other pediatric non-B-cell hematologic malignancies. *Hematology* 2020; 2020: 494–500. DOI: 10.1182/hematology.2020000134
 14. Dai Z., Mu W., Zhao Y., Jia X., Liu J., Wei Q., et al. The rational development of CD5-targeting biepitopic CARs with fully human heavy-chain-only antigen recognition domains. *Mol Ther* 2021; 29: 2707–22. DOI: 10.1016/j.ymthe.2021.07.001
 15. Raikar S.S., Fleischer L.C., Moot R., Fedanov A., Paik N.Y., Knight K.A., et al. Development of chimeric antigen receptors targeting T-cell malignancies using two structurally different anti-CD5 antigen binding domains in NK and CRISPR-edited T cell lines. *Oncoimmunology* 2018; 7: e1407898. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1407898
 16. Hill L.C., Rouse R.H., Smith T.S., Boriskie B., Srinivasan M., Thakkar S.G., et al. Enhanced anti-tumor activity of CD5 CAR T cells manufactured with tyrosine kinase inhibitors in patients with relapsed/refractory T-ALL. *JCO* 2023; 41: 7002. DOI: 10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.7002
 17. Mamonkin M., Rouse R.H., Tashiro H., Brenner M.K. A T-cell-directed chimeric antigen receptor for the selective treatment of T-cell malignancies. *Blood* 2015; 126: 983–92. DOI: 10.1182/blood-2015-02-629527
 18. Hill L.C., Rouse R.H., Wu M.J., Wang T., Ma R., Zhang H., et al. Antitumor efficacy and safety of unedited autologous CD5.CAR T cells in relapsed/refractory mature T-cell lymphomas. *Blood* 2024; 143: 1231–41. DOI: 10.1182/blood.2023022204
 19. Kernan N.A., Knowles R.W., Burns M.J., Broxmeyer H.E., Lu L., Lee H.M., et al. Specific inhibition of *in vitro* lymphocyte transformation by an anti-pan T cell (gp67) ricin A chain immunotoxin. *J Immunol* 1984; 133: 137–46. DOI: 10.4049/jimmunol.133.1.137
 20. Huang Y., Wan C.-L., Dai H., Xue S. Targeted therapy and immunotherapy for T cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Ann Hematol* 2023; 102: 2001–13. DOI: 10.1007/s00277-023-05286-3
 21. Wei W., Yang D., Chen X., Liang D., Zou L., Zhao X. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for T-ALL and AML. *Front Oncol* 2022; 12: 967754. DOI: 10.3389/fonc.2022.967754
 22. Ma J.-F., Yan C.-L., Jia X., Zhu H.-J., Yan J.-W., Liu M.-J., et al. Clinical outcomes and safety of CAR-T cells in treatment of T-Cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Ann Hematol* 2024. doi: 10.1007/s00277-024-06132-w
 23. Cooper M.L., Choi J., Staser K., Ritchey J.K., Devenport J.M., Eckardt K., et al. An “off-the-shelf” fratricide-resistant CAR-T for the treatment of T cell hematologic malignancies. *Leukemia* 2018; 32: 1970–83. DOI: 10.1038/s41375-018-0065-5
 24. Ma R., Woods M., Burkhardt P., Crooks N., Van Leeuwen D.G., Shmidt D., et al. Chimeric antigen receptor-induced antigen loss protects CD5.CART cells from fratricide without compromising on-target cytotoxicity. *Cell Rep Med* 2024; 5: 101628. DOI: 10.1016/j.xcrm.2024.101628
 25. Mamonkin M., Mukherjee M., Srinivasan M., Sharma S., Gomes-Silva D., Mo F., et al. Reversible transgene expression reduces fratricide and permits 4-1BB costimulation of CAR T cells directed to t-cell malignancies. *Cancer Immunol Res* 2018; 6: 47–58. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0126
 26. López-Cantillo G., Urueña C., Camacho B.A., Ramírez-Segura C. CAR-T cell performance: how to improve their persistence? *Front Immunol* 2022; 13: 878209. DOI: 10.3389/fimmu.2022.878209
 27. Malakhova E., Pershin D., Kulakovskaya E., Vedmedskaia V., Fadeeva M., Lodoeva O., et al. Extended characterization of anti-CD19 CAR T cell products manufactured at the point of care using the CliniMACS Prodigy system: comparison of donor sources and process duration. *Cytotherapy* 2024; 26: 567–78. DOI: 10.1016/j.jcyt.2024.02.025