

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 13.03.2024
Принята к печати 08.04.2024



EDN: GEE0YX

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-128-139

Сравнительная характеристика клеточного состава и функциональных свойств анти-CD19-биомедицинских клеточных продуктов, произведенных с помощью платформ CliniMACS Prodigy и G-Rex

Е.А. Малахова^{1,2}, Д.Е. Першин¹, В.А. Ведмедская¹, М.С. Фадеева¹, Е.А. Кулаковская¹,
О.Б. Лодоева¹, Т.А. Созонова¹, Э.Я. Мусаева¹, Я.О. Музалевский¹, А.С. Казаченок¹,
В.Е. Бельчиков¹, А.К. Мелькова¹, Л.Н. Шелихова¹, О.О. Молостова¹, Е.А. Бадрин¹, 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, Пущино

Контактная информация:

Малахова Екатерина Андреевна,
врач клинической лабораторной
диагностики лаборатории
трансплантационной иммунологии
и иммунотерапии гемобластозов
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России; научный сотрудник
ФГБУН ИТЭБ РАН
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: mallahovka@yandex.ru

На сегодняшний день применение анти-CD19-биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) для лечения В-клеточных опухолей становится все более популярным и показывает впечатляющие результаты. Разработано несколько биореакторов, позволяющих производить высококачественные клеточные продукты для последующего клинического применения, вопрос выбора которых остается актуальным. В данном исследовании представлена сравнительная характеристика иммунофенотипических и функциональных свойств анти-CD19-БМКП, произведенных с помощью автоматизированной системы CliniMACS Prodigy (Milteny Biotec, Германия) и неавтоматизированной платформы G-Rex 10M-CS (Wilson Wolf, США). Производство БМКП и последующая CAR-T-клеточная терапия осуществлялись на базе ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева». Донорами Т-лимфоцитов являлись пациенты, перенесшие ТГСК, а также аутологичные и аллогенные доноры. В исследование были включены 26 анти-CD19-БМКП, производство которых осуществлялось в соответствии с требованиями GMP с использованием автоматизированной системы CliniMACS Prodigy, а также 25 клеточных продуктов, полученных с помощью платформы G-Rex. Исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Контроль качества осуществлялся на протяжении всего производственного цикла и включал в себя оценку клеточного состава, выживаемости, эффективности трансдукции, клеточной экспансии, экспрессии маркеров истощения, а также противоопухолевой анти-CD19-специфической активности. Исследование показало, что в финале производства мы получаем стабильные высококачественные продукты с достаточной для последующей CAR-T-терапии клеточной экспансией, жизнеспособностью и трансдукцией Т-лимфоцитов при использовании обеих производственных платформ. При этом медиана эффективности трансдукции была статистически значимо выше в БМКП, изготовленных с использованием платформы CliniMACS Prodigy, и составила 41%, в то время как при производстве с помощью биореактора G-Rex она достигла 26%. Исследование показало, что в анти-CD19-БМКП наблюдаются преобладание популяции T_{scm} над T_{em}, низкая экспрессия маркеров клеточного истощения, а также выраженная анти-CD19-специфическая активность. Однако в БМКП, произведенных с помощью платформы CliniMACS Prodigy, содержание T_{scm} статистически значимо выше по сравнению с продуктами, изготовленными в биореакторе G-Rex (86,7% CD8⁺ T_{scm}-лимфоцитов и 82,3% CD4⁺ T_{scm}-лимфоцитов для CliniMACS Prodigy; 69,0% CD8⁺ T_{scm}-лимфоцитов и 72,0% CD4⁺ T_{scm}-лимфоцитов для G-Rex). Несмотря на более низкое содержание анти-CD19 CAR-T-лимфоцитов в финальных клеточных продуктах, полученных в биореакторе G-Rex, во всех процессах этого количества было достаточно для последующей CAR-T-терапии. Таким образом, платформы CliniMACS Prodigy и G-Rex могут быть использованы для производства высококачественных анти-CD19-БМКП.

Ключевые слова: CliniMACS Prodigy, G-Rex, иммунотерапия, биомедицинский клеточный продукт, CAR-T-клеточная терапия

Малахова Е.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 128–39. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-128-139

Comparative characterization of the cell composition and functional properties of anti-CD19 biomedical cell products manufactured using the CliniMACS Prodigy and G-Rex platforms

Е.А. Malakhova^{1,2}, D.E. Pershin¹, V.A. Vedmedskaya¹, M.S. Fadeeva¹, E.A. Kulakovskaya¹, O.B. Lodoeva¹,
T.A. Sozonova¹, E.Ya. Musaeva¹, Ya.O. Muzalevsky¹, A.S. Kazachenok¹, V.E. Belchikov¹, A.K. Melkova¹,
L.N. Shelikhova¹, O.O. Molostova¹, E.A. Badrin¹, 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, Pushchino

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 13.03.2024

Accepted 08.04.2024

Today, the use of anti-CD19 biomedical cell products (BMCPs) for the treatment of B-cell malignancies yields impressive results and is becoming ever more popular. Several bioreactors have been developed that allow the manufacturing of high-quality cell products for clinical use. Choosing an appropriate bioreactor is an important step in this process. The aim of this study was to characterize and compare immunophenotypic and functional properties of anti-CD19 BMCPs manufactured using the automated CliniMACS Prodigy system (Miltenyi Biotec, Germany) and the manual G-Rex 10M-CS platform (Wilson Wolf, USA). The manufacturing of BMCPs and subsequent CAR T-cell therapy were carried out at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of Russia. We used T cells from patients who had undergone HSCT as well as from autologous and allogeneic donors. In this study, we employed 26 anti-CD19 BMCPs manufactured using the automated CliniMACS Prodigy system in accordance with the GMP requirements as well as 25 cell products produced with the G-Rex platform. 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. Quality control was ensured throughout the entire manufacturing cycle and included assessment of cell composition and survival, transduction efficiency, cell expansion, expression of exhaustion markers, and CD19-specific antitumor activity. Our research showed that both manufacturing platforms generate stable high-quality products with sufficient cell expansion, viability and T cell transduction for subsequent CAR-T therapy. However, the median transduction efficiency of the BMCPs produced using the CliniMACS Prodigy platform was statistically significantly higher than that of the BMCPs manufactured using the G-Rex bioreactor (41% vs 26%). The study showed that in the anti-CD19 BMCPs, there was a predominance of Tcm subpopulation over Tem subpopulation, a low expression of exhaustion markers and a pronounced CD19-specific activity. Nevertheless, the percentage of Tcm cells in the BMCPs manufactured using the CliniMACS Prodigy platform was statistically significantly higher than in the BMCPs produced using the G-Rex bioreactor (86.7% CD8⁺ Tcm cells and 82.3% CD4⁺ Tcm cells for CliniMACS Prodigy vs 69.0% CD8⁺ Tcm cells and 72.0% CD4⁺ Tcm cells for G-Rex). Despite the lower number of anti-CD19 CAR-T cells in the final cell products obtained with the G-Rex bioreactor, in all processes this amount was sufficient for subsequent CAR-T therapy. Thus, the CliniMACS Prodigy and G-Rex platforms can be used to produce high-quality anti-CD19 BMCPs.

Key words: CliniMACS Prodigy, G-Rex, immunotherapy, biomedical cell product, CAR T-cell therapy

Malakhova E.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 128–39.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-128-139

В течение последних десятилетий был достигнут огромный прогресс в понимании механизмов противоопухолевого иммунитета и опухолевой прогрессии. Это привело к появлению совершенно нового подхода к лечению злокачественных новообразований – адаптивной клеточной терапии с использованием генетически модифицированных клеток иммунной системы: Т-лимфоцитов [1, 2], NK-клеток [2, 3], $\gamma\delta$ -Т-клеток [4], NKT-клеток [5], макрофагов [6], экспрессирующих на своей поверхности химерные антигенные рецепторы (chimeric antigen receptor, CAR). В настоящее время по всему миру активно проводятся клинические испытания, по данным ClinicalTrials.gov, зарегистрировано около 1500 CAR-T- и 70 CAR-NK-клеточных исследований. Начиная с 2017 г. Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration) одобрено 6 CAR-T-клеточных продуктов для лечения онкогематологических заболеваний [7]. Использование коммерчески доступных CAR-T-клеточных продуктов показало впечатляющие результаты при лечении злокачественных рецидивирующих/рефрактерных В-клеточных новообразований [8, 9]. Однако длительность такого производства, высокая стоимость, сложности с логистикой, требующей дополнительного времени и криоконсервации CAR-T-клеточного продукта, – все это ограничивает возможность применения терапии. Производство биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) и последующее их применение в условиях одного медицинского центра помогает избежать этих проблем и сделать данный способ лечения экономически более доступным [10, 11]. Таким образом, на сегодняшний день актуальной задачей является повышение доступности технологии производства CAR-T-лимфоцитов, что сопровождается появлением различных систем, начиная с

мешков для культивирования из полимерных материалов, заканчивая полностью автоматизированными платформами [12].

Система CliniMACS Prodigy является наиболее широко используемой для автоматизированного производства CAR-T-клеточных продуктов [12–14]. Данная платформа предоставляет возможность производить БМКП в том же месте, где будет проводиться последующая терапия [13, 15–17]. Система CliniMACS Prodigy позволяет выполнять основные этапы производства, такие как магнитная сепарация, активация, трансдукция и экспансия CAR-T-лимфоцитов в стерильной закрытой системе. Платформа требует минимального вмешательства пользователя, снижая риск контаминации, позволяет производить БМКП, соответствующий требованиям надлежащей производственной практики (Good Manufacturing Practice, GMP) [13, 16].

Еще одним очень популярным устройством для производства БМКП является система G-Rex, которая представляет собой колбу со специальной газопроницаемой силиконовой мембраной на дне [18, 19]. Использование системы G-Rex показывает высокую эффективность культивирования клеток и позволяет успешно производить клинические БМКП. Силиконовая мембрана обеспечивает оптимальный газообмен, а большой объем среды – достаточное количество питательных веществ для клеток [18, 20]. Производство БМКП в системе G-Rex является экономически более выгодным, чем в CliniMACS Prodigy, однако требует большего вмешательства со стороны человека [12].

В данном исследовании мы представляем сравнение клеточного состава и функциональных свойств клинических анти-CD19 БМКП, произведенных с помощью платформ G-Rex и CliniMACS Prodigy.

Correspondence:

Ekaterina A. Malakhova,
MD in Clinical Laboratory Medicine
at the Laboratory of Transplantation
Immunology and Immunotherapy of Blood
Malignancies at the Dmitry Rogachev
National Medical Research Center of Pediatric
Hematology, Oncology and Immunology
of Ministry of Healthcare of the Russian
Federation; a researcher at the Institute
of Theoretical and Experimental Biophysics
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: mallahovka@yandex.ru

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациенты

В нашем исследовании были произведены 51 анти-CD19-БМКП: 26 с помощью системы CliniMACS Prodigy и 25 с помощью платформы G-Rex. В работе применяли CAR второго поколения с костимулирующим доменом 4-1BB и трансмембранным доменом TNFRSF19 (белок суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 19). Изготовленные анти-CD19-БМКП использовали для лечения педиатрических пациентов с рецидивирующим/рефрактерным В-клеточным острым лимфобластным лейкозом (~5% пациентов с В-клеточной лимфомой). Медиана возраста в выборке доноров при использовании CliniMACS Prodigy составила 11 лет, G-Rex – 32 года. Данное исследование было одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева». Доноры и пациенты предоставили письменное согласие на участие в исследовании. Все этапы подготовки и самой процедуры изготовления БМКП проводились в соответствии с правилами GMP.

Производство анти-CD19-биомедицинских клеточных продуктов с помощью платформы CliniMACS Prodigy

Для успешного производства БМКП каждому донору производилась предварительная оценка содержания наивных Т-лимфоцитов в периферической крови. В исследование включались доноры, имеющие более 50 клеток/мкл. В день –1 осуществляли сбор мононуклеарных клеток периферической крови на автоматическом сепараторе Spectra Optia (TERUMO BCT), после чего определяли количество Т-лимфоцитов в полученном продукте (стадия лейкофереза). В день 0 продукт лейкофереза в количестве $3\text{--}5 \times 10^8$ Т-клеток разводили буфером CliniMACS PBS/EDTA GMP (Milteny Biotec, Германия), содержащим 0,5% сывороточного альбумина человека, который затем помещали в систему CliniMACS Prodigy для последующей селекции CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов. Процесс селекции проводили с использованием реагентов Microbeads CliniMACS CD4 GMP Reagent (Milteny Biotec, Германия) и CliniMACS CD8 GMP Reagent (Milteny Biotec, Германия). Затем 100×10^6 полученных Т-лимфоцитов активировали в среде TechMACS GMP (Milteny Biotec, Германия), содержащей 12,5 нг/мл рекомбинантных человеческих IL-7 и IL-15 MACS GMP (Milteny Biotec, Германия), с добавлением реагента MACS GMP T-cell TransAct (Milteny Biotec, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Через 24 ч к активированным Т-лимфоцитам добавляли лентивирусный

вектор aCD19 CAR SF (рисунок 1А) (Milteny Biotec, Германия), после чего клетки инкубировали в течение 2 дней. На день +3 продукт отмывали и продолжали культивирование. Замену среды осуществляли каждые 24 ч, начиная с дня +5. Длительность производственного процесса составляла 7 дней (рисунок 1Б).

Производство анти-CD19-биомедицинских клеточных продуктов с помощью платформы G-Rex

В день 0 осуществляли взятие периферической крови в пробирки CPT (Becton Dickinson, США) с последующим выделением мононуклеарных клеток согласно протоколу производителя. Затем фракции CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов сортировали с использованием антител CD4-VioBlue human GMP (Milteny Biotec, Германия) и CD8-APC human GMP (Milteny Biotec, Германия) с помощью MACSQuant Tyto (Milteny Biotec, Германия). После процесса сортировки 5×10^6 Т-лимфоцитов помещали в биореактор G-Rex 10M-CS и активировали в среде TechMACS GMP (Milteny Biotec, Германия), содержащей 12,5 нг/мл рекомбинантных человеческих IL-7 и IL-15 MACS GMP (Milteny Biotec, Германия) с добавлением реагента MACS GMP T-cell TransAct (Milteny Biotec, Германия). Через 24 ч к активированным Т-лимфоцитам добавляли лентивирусный вектор aCD19 CAR SF (Milteny Biotec, Германия), после чего клетки инкубировали в течение 2 дней. На день +3 осуществляли доливку среды. Замену среды производили 1 раз на день +7. Длительность процесса производства составляла 9 дней (рисунок 1В).

Культивирование клеточной линии

Клеточную линию мантийноклеточной лимфомы Jeko-1, экспрессирующую CD19, культивировали в среде RPMI-1640 (Stemcell Technologies, Канада) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Stemcell Technologies, Канада), 1% пенициллина-стрептомицина (Gibco, США) и 2 мМ L-глутамин (Servicebio, Китай). Клетки поддерживали в концентрации $4\text{--}6 \times 10^5$ клеток/мл в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂.

Анализ дегрануляции и внутриклеточной секреции цитокинов

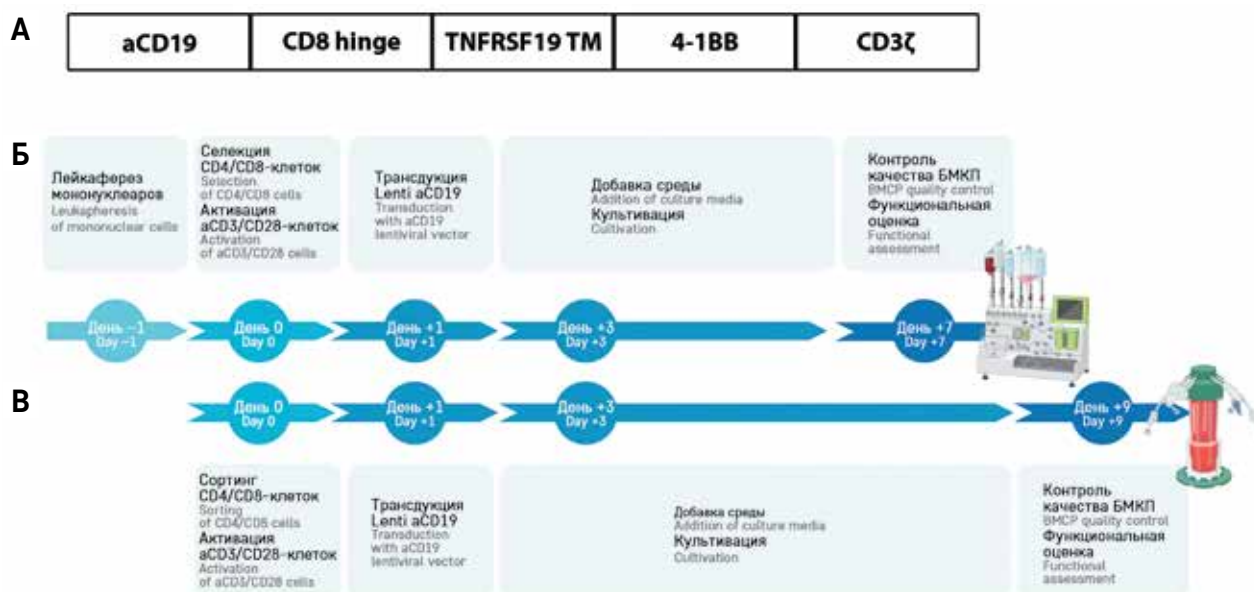
Функциональное тестирование анти-CD19-БМКП включало исследование дегрануляции и анализ секреции цитокинов фактор некроза опухоли-α (ФНО-α), интерферон-γ (ИФН-γ) после инкубации с клеточной линией Jeko-1. Перед функциональной оценкой анти-CD19-БМКП культивировали в среде TechMACS (Milteny Biotec, Германия) без добавления IL-7, IL-15 в течение 24 ч. Для оценки дегрануляции анти-CD19-БМКП инкубировали с клеточной линией Jeko-1 в соотношении 1:1 в количестве

Рисунок 1

А – структура лентивирусного вектора, кодирующего CAR. Схемы процессов производства анти-CD19-БМКП с помощью платформ CliniMACS Prodigy (Б) и G-Rex (В)

Figure 1

The structure of a lentiviral vector encoding CAR (A). Schematics showing the manufacturing processes for anti-CD19 biomedical cell products (BMCP) on the CliniMACS Prodigy (Б) and G-Rex (В) platforms



2×10^5 клеток на лунку в течение 2 ч при 37°C и 5% CO₂ с добавлением моноклонального антитела CD107a-PE (Becton Dickinson, США). Для исследования секреции цитокинов клетки инкубировали в тех же условиях в течение 3 ч с добавлением GlogiPlug (Becton Dickinson, США). Затем образцы отмывали и инкубировали с панелями антител CD8-FITC (Miltenyi Biotec, Германия), CD107a-PE (Becton Dickinson, США), CD4-APC-Cy7 (Miltenyi Biotec, Германия) для оценки дегрануляции и CD8-VioGreen (Miltenyi Biotec, Германия), CD4-APC-Cy7 (Miltenyi Biotec, Германия), CD3-APC (Becton Dickinson, США), 7-AAD-PerCP (Becton Dickinson, США) для анализа секреции цитокинов. Внутриклеточное окрашивание ФНО-α и ИФН-γ осуществляли по протоколу производителя Inside Stain Kit (Miltenyi Biotec, Германия), используя антитела TNF-α-PE-Vio-770 (Miltenyi Biotec, Германия) и IFNγ-PE (Miltenyi Biotec, Германия). Эффективность внутриклеточной секреции цитокинов и поверхностную экспрессию CD107a на Т-лимфоцитах оценивали с помощью проточного цитометра CytoFlex (Beckman Coulter, США). Для каждого образца в регионе CD3⁺ было собрано не менее 50 000 событий. Данные обрабатывали с помощью программы CytExpert версии 2.3.

В качестве контроля в функциональных тестах использовали Т-лимфоциты (МОСК-клетки), эффект которых вычитали из эффекта анти-CD19-БМКП. Для сравнения результатов эффективности экспрессии CD107a и внутриклеточной секреции ФНО-α, ИФН-γ мы нормализовали полученные данные на процент трансдукции.

Оценка клеточного состава продуктов селекции, сортировки и анти-CD19-биомедицинских клеточных продуктов

Для оценки качества производства анти-CD19-БМКП использовали метод проточной цитометрии. На стадиях лейкофереза, в стартовых продуктах сортировки и селекции, а также в финальных анти-CD19-БМКП оценивали клеточный состав и жизнеспособность, используя панель антител А, представленную в таблице 1. Для определения эффективности трансдукции анти-CD19-БМКП инкубировали с CD19 CAR Detection Reagent Biotin (Miltenyi Biotec, Германия). Затем клетки отмывали и инкубировали с панелью антител Б (таблица 1). Образцы в описанных выше экспериментах анализировали с помощью проточного цитометра MACSQuant. Для каждого исследования было собрано не менее 100 000 событий в регионе CD3⁺. Данные обрабатывали с помощью программы MACS Quantify версии 2.13.1.

В продуктах сортировки и селекции, а также в финальных анти-CD19-БМКП оценивали состав Т-клеток памяти и экспрессию маркеров истощения. Состав Т-клеток памяти охарактеризовали по экспрессии маркеров CD197 и CD45RA: T_n – CD3⁺CD197⁺CD45RA⁺ (наивные), T_{cm} – CD3⁺CD197⁺CD45RA⁻ (центральные), T_{em} – CD3⁺CD197⁻CD45RA⁻ (эффекторные), T_{EMRA} – CD3⁺CD197⁻CD45RA⁺ (терминально дифференцированные эффекторные).

Экспрессию маркеров истощения в продуктах селекции и анти-CD19-БМКП, произведенных с

помощью системы CliniMACS Prodigy, оценивали, используя панель антител В, состав Т-клеток памяти – панель Г (таблица 1). Для определения состава Т-клеток памяти и экспрессии маркеров истощения в продуктах сортирования и анти-CD19-БМКП, полученных с использованием биореактора G-Rex, применяли панели антител Д, Е (таблица 1). Образцы, описанные выше, анализировали с использованием проточного цитометра CytoFlex (Beckman Coulter, США). Для каждого исследования было собрано не менее 50 000 событий в регионе CD3+. Данные обрабатывали с помощью программы CytExpert версии 2.3.

Статистический анализ

Для статистической обработки результатов исследования использовали программу GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США). Уровень статистической значимости описывался как *, **, *** и **** для значений $p < 0,05$, $< 0,01$, $< 0,001$ и $< 0,0001$ соответственно. Для сравнения 2 выборок применяли непарный критерий Манна–Уитни. Для поиска корреляции между 2 выборками использовали критерий Спирмена.

Таблица 1

Используемые панели антител

Tables 1

Antibody panels used in the study

Панель А – Клеточный состав Panel A – Cell composition	Панель Б – Клеточная трансдукция Panel B – Cell transduction	Панель В – Клеточное истощение, Prodigy Panel B – Cell exhaustion, Prodigy	Панель Г – Фенотип популяций Т-клеток памяти, Prodigy Panel G – Phenotype of memory T cell populations, Prodigy	Панель Д – Клеточное истощение, G-Rex Panel D – Cell exhaustion, G-Rex	Панель Е – Фенотип популяций Т-клеток памяти, G-Rex Panel E – Phenotype of memory T cell populations, G-Rex
CD45-VioBlue human (Miltenyi Biotec, 5B1, Germany)	CD45-VioBlue human (Miltenyi Biotec, 5B1, Germany)	TIGIT-PE-Vio770 human (Miltenyi Biotec, REA1004, Germany)	CD45RA-PerCP human (Miltenyi Biotec, T6D11, Germany)	TIGIT-PE-Vio770 human (Miltenyi Biotec, REA1004, Germany)	CD45RA-Alexa Fluor 700 human (Beckman Coulter, 2H4LDH11LDB9, USA)
CD4-VioGreen human (Miltenyi Biotec, REA623, Germany)	CD4-VioGreen human (Miltenyi Biotec, REA623, Germany)	CD4-VioGreen human (Miltenyi Biotec, VIT4, Germany)	CD4-VioGreen human (Miltenyi Biotec, VIT4, Germany)	CD4-VioBlue human (Miltenyi Biotec, M-T466, Germany)	CD4-VioBlue human (Miltenyi Biotec, M-T466, Germany)
CD3-FITC human (Miltenyi Biotec, REA613, Germany)	CD3-FITC human (Miltenyi Biotec, BW264/56, Germany)	CD3-PE-Vio615 human (Miltenyi Biotec, REA613, Germany)	CD3-PE-Vio615 human (Miltenyi Biotec, REA613, Germany)	CD3-VioGreen human (Miltenyi Biotec, REA613, Germany)	CD3-VioGreen human (Miltenyi Biotec, REA613, Germany)
CD8-APC-Vio770 human (Miltenyi Biotec, REA734, Germany)	CD8-APC-Vio770 human (Miltenyi Biotec, REA734, Germany)	CD8-Qdot655 human (Invitrogen, 3B5, USA)	CD8-APC-Vio770 human (Miltenyi Biotec, REA734, Germany)	CD8-APC human (Miltenyi Biotec, BW135/80, Germany)	CD8-APC human (Miltenyi Biotec, BW135/80, Germany)
7AAD-Per-CP (Miltenyi Biotec, Germany)	7AAD-Per-CP (Miltenyi Biotec, Germany)	7AAD-Per-CP (Miltenyi Biotec, Germany)	CD197-PE-Vio770 human (Miltenyi Biotec, REA108, Germany)	7AAD-Per-CP (Miltenyi Biotec, Germany)	7AAD-Per-CP (Miltenyi Biotec, Germany)
CD19-PE-Vio770 human (Miltenyi Biotec, LT19, Germany)	Anti-Biotin-PE human (Miltenyi Biotec, REA746, Germany)	CD279-Vio Bright FITC human (Miltenyi Biotec, PD1.3.1.3, Germany)		CD279-Vio Bright FITC human (Miltenyi Biotec, PD1.3.1.3, Germany)	CD279-Vio Bright FITC human (Miltenyi Biotec, PD1.3.1.3, Germany)
CD14-APC human (Miltenyi Biotec, REA599, Germany)	CD14-APC human (Miltenyi Biotec, REA599, Germany)				CD197-PE-Vio770 human (Miltenyi Biotec, REA108, Germany)
CD56-PE human (Miltenyi Biotec, REA196, Germany)					CD45-PE-Vio615 human (Miltenyi Biotec, REA747, Germany)
CD16-PE human (Miltenyi Biotec, REA423, Germany)					

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В нашем исследовании были успешно произведены 51 анти-CD19-БМКП: 26 с помощью автоматизированной системы CliniMACS Prodigy и 25 с использованием неавтоматизированной платформы G-Rex. К концу культивирования в CliniMACS Prodigy количество Т-лимфоцитов возросло в 15,6 раза, достигнув $1,6 \times 10^9$ ($0,4\text{--}2,5 \times 10^9$). При производстве в системе G-Rex число Т-клеток увеличилось в 48 раз, составив $2,4 \times 10^8$ ($1\text{--}3,9 \times 10^8$) (рисунки 2А). Отмечается преобладание CD4+ Т-лимфоцитов, медиана CD4/CD8 для процессов в CliniMACS Prodigy не изменилась в ходе культивирования и составила 1,3. Для процессов в G-Rex медиана снизилась с 2,1 на старте производства до 1,2 в финале (рисунки 2Б, В). Эффективность трансдукции статистически значимо преобладала в анти-CD19-БМКП, произведенных в системе CliniMACS Prodigy, и достигла 41,0% (19,4–60,6%) от CD3+, в то время как в процессах, полученных с помощью G-Rex, медиана составила 26,3% (13,2–38,7%) (рисунки 2Г). Несмотря

Рисунок 2

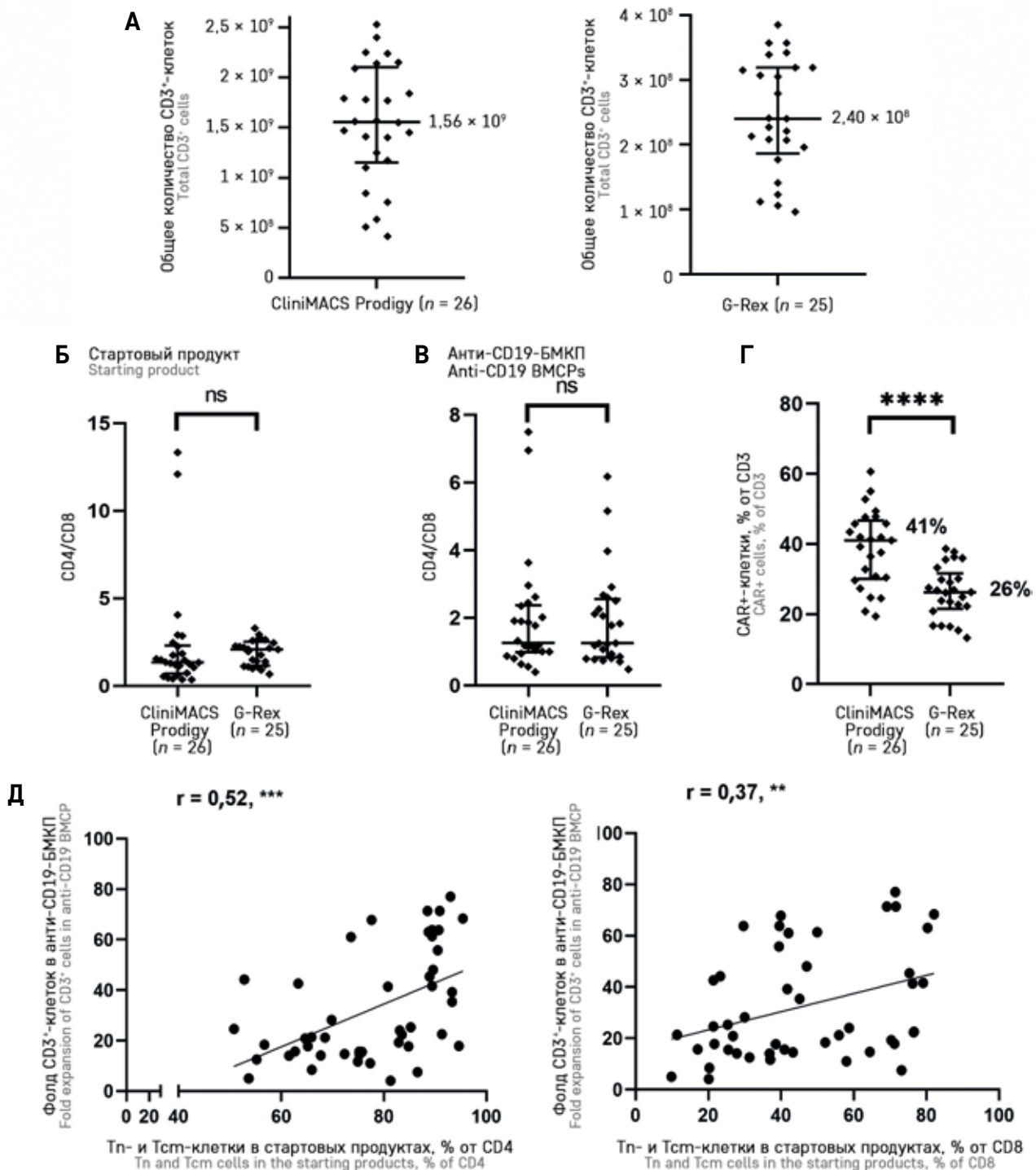
А – общее количество $CD3^+$ -лимфоцитов в анти-CD19-БМКП, произведенных с помощью платформ CliniMACS Prodigy (слева) и G-Rex (справа). Влияние способа производства на $CD4/CD8$ в стартовых продуктах (Б) и в финальных анти-CD19-БМКП (В). Г – влияние типа производственной платформы на эффективность трансдукции в финальных анти-CD19-БМКП. Д – корреляция между суммой Т-наивных и Т-клеток центральной памяти в стартовых продуктах в $CD4^+$ (слева) и $CD8^+$ (справа) лимфоцитах и значениями прироста клеток в финальных анти-CD19-БМКП.

Для рисунков А–Г представлены медианы с межквартильными размахами. Уровень статистической значимости описывался как ns – незначимый; *, **, *** и **** для значений $p < 0,05$, $< 0,01$, $< 0,001$ и $< 0,0001$ соответственно.

Figure 2

А – a total number of $CD3^+$ cells in the anti-CD19 BMCPs manufactured using the CliniMACS Prodigy (left) and G-Rex (right) platforms. The effect of the manufacturing method on the $CD4/CD8$ ratio in the starting products (Б) and in the final anti-CD19 BMCPs (В). Г – the effect of the type of manufacturing platform on transduction efficiency in the final anti-CD19 BMCPs. Д – a correlation between the sum of naïve and central memory T cells in the starting products in $CD4^+$ (left) and $CD8^+$ (right) cells and cell growth values in the final anti-CD19 BMCPs.

For Figures А–Г, medians with interquartile ranges are presented. Statistical significance was described as follows: ns, not significant; * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$; **** – $p < 0.0001$.



на полученную разницу в значениях трансдукции, в данном исследовании количество необходимых CAR-специфичных Т-лимфоцитов было достигнуто для всех процессов.

Анти-CD19-БМКП, произведенные с помощью обеих платформ, в основном были представлены CD3⁺-лимфоцитами. В части продуктов, изготовленных в CliniMACS Prodigy, встречалась популяция CD3⁺CD56⁺, медиана составила 2,0% (0,6–24,2%), в G-Rex-процессах – 0,8% (0,1–3,7%). Других клеточных популяций (моноцитов, нейтрофилов, эозинофилов), включая CD19⁺ В-лимфоциты и бластные клетки, при производстве на обеих платформах обнаружено не было. Содержание NK-клеток во всех процессах не превышало 0,2%.

Характеристика анти-CD19-БМКП, а также продуктов, полученных после процессов сортировки или селекции, представлены в *таблицах 2, 3*. Нами продемонстрировано, что CD4⁺ Т-лимфоциты в продуктах сортировки и селекции в основном представлены популяциями T_H и T_{CM}. CD8⁺ Т-лимфоциты также содержали TEMRA: в продукте селекции – 24,1%, в продукте сортировки – 17,3% (*рисунок 3А*). Количество CD4⁺ T_H-лимфоцитов было незначительно выше в продуктах сортировки ($p = 0,0459$), а число CD4⁺ T_{CM}-лимфоцитов преобладало в продуктах селекции ($p = 0,0102$) (*таблица 2*). Статистически значимых различий в составе CD8⁺ Т-лимфоцитов обнаружено не было. Также мы обнаружили положительную корреляцию между популяциями, имеющими высокий пролиферативный потенциал (сумма Т-наивных и Т-клеток центральной памяти в CD8⁺- и CD4⁺-лимфоцитах соответственно) в стартовых продуктах, и значениями прироста клеток в финальных анти-CD19-БМКП ($r = 0,52$ для CD4⁺, $r = 0,37$ для CD8⁺) (*рисунок 2Д*).

В финале производства анти-CD19-БМКП, полученные с помощью платформ CliniMACS Prodigy и G-Rex, были представлены популяциями T_{CM}-и T_{EM}-клеток памяти (*таблица 3*). При этом в продуктах, произведенных с помощью системы CliniMACS Prodigy, наблюдалось более выраженное преобладание популяции T_{CM} над T_{EM} в CD4⁺ ($p = 0,0277$) и CD8⁺ ($p = 0,0001$) Т-лимфоцитах по сравнению с БМКП, полученными в G-Rex (*рисунок 3Б*). Количество T_{EM}, соответственно, было статистически значимо выше в анти-CD19-БМКП, произведенных с помощью платформы G-Rex, по сравнению с CliniMACS Prodigy (для CD4⁺ $p = 0,0188$, для CD8⁺ $p = 0,0002$) (*рисунок 3Б*).

Анализ экспрессии маркеров клеточного источника показал, что в ходе производства анти-CD19-БМКП, содержание TIGIT и CD279 на поверхности Т-лимфоцитов, снижается (*рисунок 3В, таблицы 2, 3*). В продуктах, полученных после процессов селекции,

медиана экспрессии CD279 составляла 29,9% в CD4⁺ и 26,0% в CD8⁺ Т-лимфоцитах, при этом в финале производственного цикла количество CD279⁺ Т-клеток снижалось до 13,3% в CD4⁺ и до 7,5% в CD8⁺. В процессах с использованием платформы G-Rex наблюдались схожие изменения. В продуктах, полученных после процессов сортировки, содержание CD279 составляло 20,4% в CD4⁺ и 25,4% в CD8⁺ Т-лимфоцитах, при этом в финале производства количество CD279⁺ Т-клеток снизилось до 18,3% в CD4⁺ и до 7,6% в CD8⁺. Кроме того, было обнаружено, что уровень экспрессии TIGIT на поверхности CD4⁺ Т-лимфоцитов статистически значимо выше в процессах с использованием системы CliniMACS Prodigy в продуктах сортировки ($p = 0,0477$) и финальных анти-CD19-БМКП ($p = 0,0046$) (*рисунок 3В, таблицы 2, 3*). При этом статистически значимых различий в уровне экспрессии CD279 при использовании разных производственных платформ найдено не было.

Анализ функциональной активности показал, что все анти-CD19-БМКП, произведенные с помощью платформ CliniMACS Prodigy и G-Rex, экспрессировали CD107a и продуцировали ФНО-α после инкубации с клеточной линией Jeko-1. При этом уровни экспрессии CD107a и секреции ФНО-α статистически значимо были выше в процессах с использованием системы CliniMACS Prodigy ($p < 0,0001$) (*рисунок 3Г, таблица 3*). Внутриклеточная секреция ИФН-α в анти-CD19-БМКП, произведенных с помощью платформы G-Rex, практически отсутствовала, медиана составила 1,1% (0,3–9,9%), в то время как в процессах с использованием CliniMACS Prodigy выработка ИФН-α достигла 20,4% (2,0–51,7%).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Производство БМКП, соответствующее требованиям GMP, в местах оказания высокотехнологичной медицинской помощи делает CAR-T-терапию более доступной. Вместе с ростом количества различных видов БМКП появляется все больше платформ, способных обеспечить их высококачественное клиническое производство [12]. В данном исследовании мы представили сравнение анти-CD19-БМКП, изготовленных с помощью 2 наиболее часто используемых технологий: системы CliniMACS Prodigy ($n = 26$) и платформы G-Rex ($n = 25$). Наша работа подтверждает предыдущие сообщения о том, что с помощью обеих платформ можно получить анти-CD19-БМКП высокого качества, имеющий удовлетворительные параметры трансдукции и достаточное количество клеток для дальнейшего клинического применения. В настоящий момент отсутствуют четкие рекомендации относительно доз использования анти-CD19-БМКП, более того, для каждого

Рисунок 3

А – состав $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов в продуктах селекции (слева) и сортировки (справа). Б – влияние типа производственной платформы на процент $CD4^+$ Tcm, $CD4^+$ Tem, $CD8^+$ Tcm, $CD8^+$ Tem (слева направо) в анти-CD19-БМКП. В – влияние типа производственной платформы на экспрессию маркеров клеточного истощения TIGIT, CD279 в $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитах в анти-CD19-БМКП. Г – влияние типа производственной платформы на экспрессию CD107a и выработку цитокинов (ФНО- α и ИФН- γ) после инкубации анти-CD19-БМКП с клеточной линией Јеко-1. Для рисунка А представлены медианные значения; для рисунков Б–Г – медианы с межквартильными размахами. Уровень статистической значимости описывался как ns – незначимый; *, **, *** и **** для значений $p < 0,05$, $< 0,01$, $< 0,001$ и $< 0,0001$ соответственно.

Figure 3

A – the composition of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in the products of selection (left) and products of sorting (right). Б – the effect of the type of manufacturing platform on the percentage of $CD4^+$ Tcm, $CD4^+$ Tem, $CD8^+$ Tcm, $CD8^+$ Tem (from left to right) in the anti-CD19 BMCPs. B – the effect of the type of manufacturing platform on the expression of T cell exhaustion markers TIGIT and CD279 in $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in anti-CD19 BMCP. Г – the effect of the type of manufacturing platform on CD107a expression and cytokine production (TNF- α and IFN- γ) after the incubation of anti-CD19 BMCP with the Јеко-1 cell line. Tn – naive T cells; Tcm – central memory T cells; Tem – effector memory T cells; TEMRA – terminally differentiated effector memory cells, median values are presented. For Figure A, median values are presented; for Figures Б–Г, medians with interquartile ranges are presented. Statistical significance was described as follows: ns, not significant; * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$; **** – $p < 0.0001$.

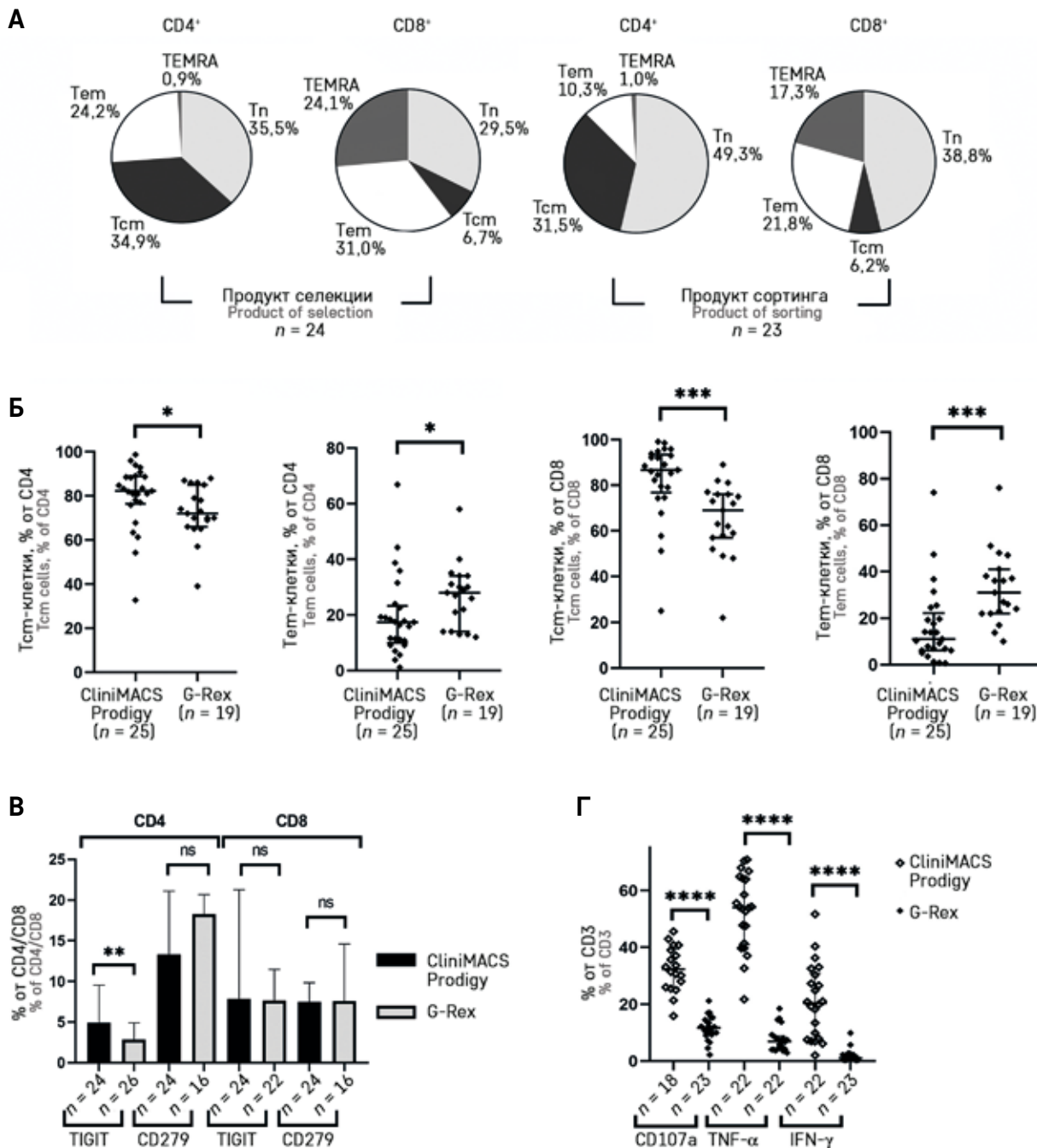


Таблица 2

Основные характеристики продуктов сортирования и селекции на старте изготовления БМКП

Tables 2

The main characteristics of sorting and selection products at the start of BMCP manufacturing process

Клеточные популяции Cell populations	Продукт селекции Product of selection	Продукт сортирования Product of sorting	p-значение p value
CD8 ⁺ Tn	29,5% (2,6–67,8%), n = 24	38,8% (14,4–80,9%), n = 23	ns
CD4 ⁺ Tn	35,5% (14,3–69,3%), n = 24	49,3% (16,7–78,7%), n = 23	0,0459*
CD8 ⁺ Tcm	6,7% (0,9–13,9%), n = 24	6,2% (0,6–27,5%), n = 23	ns
CD4 ⁺ Tcm	34,9% (18,1–52,4%), n = 24	31,5% (16,7–53,1%), n = 23	ns
CD8 ⁺ Tem	31,0% (6,5–65,6%), n = 24	21,8% (4,8–56,1%), n = 23	ns
CD4 ⁺ Tem	24,2% (5,0–45,2%), n = 24	10,3% (4,0–45,3%), n = 23	0,0102*
CD8 ⁺ TEMRA	24,1% (4,4–47,7%), n = 24	17,3% (3,7–55,2%), n = 23	ns
CD4 ⁺ TEMRA	0,9% (0,2–6,0%), n = 24	1,0% (0,1–5,4%), n = 23	ns
CD8 ⁺ CD279 ⁺	26,0% (1,7–67,9%), n = 24	25,4% (6,8–46,0%), n = 20	ns
CD4 ⁺ CD279 ⁺	29,9% (4,1–62,2%), n = 24	20,4% (7,0–44,8%), n = 20	ns
CD8 ⁺ TIGIT ⁺	27,0% (13,8–60,8%), n = 24	30,5% (4,8–59,1%), n = 22	ns
CD4 ⁺ TIGIT ⁺	17,6% (7,7–48,9%), n = 24	14,0% (5,4–24,0%), n = 22	0,0477*

Примечание. Представлены медианные, а также минимальные и максимальные значения (в скобках) различных характеристик. Уровень статистической значимости описывался как ns – незначимый; * – $p < 0,05$.

Notes. Data are presented as median and minimum-to-maximum range. Statistical significance was described as follows: ns, not significant; * – $p < 0.05$.

Таблица 3

Основные характеристики анти-CD19-БМКП (финальные продукты)

Tables 3

The main characteristics of the anti-CD19 BMCPs (final products)

Клеточные популяции Cell populations	CliniMACS Prodigy	G-Rex	p-значение p value
CD3 ⁺ CAR ⁺	41,0% (19,4–60,6%), n = 25	26,3% (13,2–38,7%), n = 25	< 0,0001****
CD8 ⁺ Tcm	86,7% (25,0–99,1%), n = 25	69,0% (22,0–89,0%), n = 19	0,0001***
CD4 ⁺ Tcm	82,3% (32,8–98,8%), n = 25	72,0% (39,0–88,0%), n = 19	0,0277*
CD8 ⁺ Tem	11,1% (0,7–74,0%), n = 25	31,0% (10,0–76,0%), n = 19	0,0002*
CD4 ⁺ Tem	17,4% (1,2–66,9%), n = 25	28,0% (12,0–58,0%), n = 19	0,0188*
CD8 ⁺ CD279 ⁺	7,5% (1,5–15,1%), n = 24	7,6% (0,9–30,9%), n = 16	ns
CD4 ⁺ CD279 ⁺	13,3% (4,8–42,3%), n = 24	18,3% (0,5–40,7%), n = 16	ns
CD8 ⁺ TIGIT ⁺	7,9% (3,0–29,3%), n = 24	7,7% (2,0–20,9%), n = 22	ns
CD4 ⁺ TIGIT ⁺	4,9% (2,0–16,5%), n = 24	2,9% (1,0–9,4%), n = 22	0,0046**
CD3 ⁺ CD107a ⁺	32,3% (15,9–45,6%), n = 18	11,7% (2,2–21,2%), n = 23	< 0,0001****
CD3 ⁺ TNF- α ⁺	54,1% (21,8–70,9%), n = 22	7,0% (2,9–18,5%), n = 22	< 0,0001****
CD3 ⁺ IFN- γ ⁺	20,4% (2,0–51,7%), n = 22	1,1% (0,3–9,9%), n = 23	< 0,0001****

Примечание. Представлены медианные, а также минимальные и максимальные значения (в скобках) различных характеристик. Уровень статистической значимости описывался как ns – незначимый; *, **, *** и **** для значений $p < 0,05$, $< 0,01$, $< 0,001$ и $< 0,0001$ соответственно.

Notes. Data are presented as median and minimum-to-maximum range. Statistical significance was described as follows: ns – not significant; * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$; **** – $p < 0.0001$.

отдельного вида клеточного продукта необходимо учитывать такие факторы, как опухолевая нагрузка, кинетика экспансии CAR-T и частота развития сочетанных с терапией осложнений. Наше исследование предполагало дальнейшее использование клеточного продукта в дозе 1×10^5 клеток/кг массы тела пациента. Все полученные продукты имели удовлетворительные характеристики дозы CAR-T: минимальное количество клеток при производстве на платформе G-Rex составило $1,8 \times 10^7$, при использовании CliniMACS Prodigy – $1,2 \times 10^8$. Следует отметить, что к концу культивирования в системе G-Rex число Т-клеток увеличилось в 48 раз, достигнув $2,4 \times 10^8$, в то время как в CliniMACS Prodigy количество Т-лимфоцитов возросло в 15,6 раза, составив $1,6 \times 10^9$. Данное различие согласуется с ранее опубликованными результатами [16] и может быть связано с продолжительностью процесса (CliniMACS

Prodigy – 7 дней, G-Rex – 9 дней), особенностями строения устройств для выращивания клеток, а также разным количеством CD3⁺-клеток, используемых в начале производства для активации (CliniMACS Prodigy – 100×10^6 , G-Rex – 5×10^6), что затрудняет прямое сравнение. Согласно рекомендациям производителей, в системе G-Rex 10M-CS возможно вырастить $200\text{--}400 \times 10^6$ клеток, в CliniMACS Prodigy – 5×10^9 . Еще одним важным отличием при производстве в системе CliniMACS Prodigy является возможность применения анти-CD19-БМКП для терапии без этапа криоконсервации. При использовании платформы G-Rex криоконсервация является обязательной, так как требуется более расширенный контроль качества из-за высокого риска контаминации.

Важным этапом в нашем исследовании являлась детальная характеристика состава Т-лимфоцитов на

разных этапах производства. Мы показали, что CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты в стартовых продуктах содержат значительную долю популяций Tn и Tcm, что является важным маркером качественного CAR-T-клеточного продукта. Кроме того, мы обнаружили положительную корреляцию между суммой популяций Tn и Tcm в стартовых продуктах сортировки, селекции и значениями уровня клеточной экспансии Т-лимфоцитов в анти-CD19-БМКП. Полученные нами данные согласуются с результатами другой работы, где была продемонстрирована связь между содержанием популяции Tn в CD8⁺-лимфоцитах в продуктах селекции и общим количеством CD3⁺-клеток в финальных анти-CD19-БМКП, произведенных с помощью платформы CliniMACS Prodigy [21]. На сегодняшний день отдельное внимание уделяют не только составу CD4 и CD8 Т-клеток, но и сохранению более стволового фенотипа Т-лимфоцитов. Вопрос о том, какие качественные и количественные характеристики должны демонстрировать Т-лимфоциты на старте и в финале культивирования, является предметом больших дискуссий. Так, отдельное внимание уделяют не только составу CD4- и CD8-лимфоцитов, но и сохранению максимально возможной клеточной «молодости», пытаясь так или иначе приблизить продукт к популяции Tscm, имеющей высокий пролиферативный потенциал. Например, использование ингибитора Gsk-3 (glycogen synthase kinase 3) в ряде работ демонстрирует улучшенные качества Т-клеточного продукта за счет снижения экспрессии FasL, увеличения пролиферативных свойств и уменьшения истощенности из-за снижения экспрессии PD-1 [22]. Группа исследователей D. Sommermeier и соавт. [23] показала, что использование комбинации популяций из CD8⁺ Tcm и CD4⁺ Tn-лимфоцитов для выращивания CAR-T-клеток приводит к наиболее выраженному противоопухолевому эффекту *in vivo*. Существуют исследования, показывающие, что популяции Tn и Tcm являются наиболее подходящими для трансдукции лентивирусного вектора и производства CAR-T-клеточного продукта с высокой противоопухолевой активностью и низкой экспрессией маркеров истощения [10, 23]. В нашей работе экспрессия маркеров клеточного истощения CD279 и TIGIT в продуктах сортировки и селекции наблюдалась на поверхности Т-лимфоцитов в незначительном количестве.

В нашем исследовании в финале производства анти-CD19-БМКП, изготовленные с помощью платформ CliniMACS Prodigy и G-Rex, были представлены популяциями Т-клеток памяти с преобладанием Tcm. Отсутствие Tn-лимфоцитов в финальных анти-CD19-БМКП связано с активацией и пролиферацией Т-клеток в процессе производства, которые сопровождаются потерей экспрессии маркера CD45RA

и переходом Tn в Tcm, что согласуется с ранее опубликованными данными [23, 24]. Также существуют сообщения о том, что костимулирующий домен 4-1BB, входящий в структуру CAR, способствует повышенному содержанию Tcm-лимфоцитов в финале производства, в то время как домен CD28 приводит к преобладанию популяции Tem [24, 25]. Найденное нами статистически значимое более выраженное преобладание популяции Tcm над Tem в CD4⁺ ($p = 0,0277$) и CD8⁺ ($p = 0,0001$) Т-лимфоцитах в анти-CD19-БМКП, изготовленных с помощью системы CliniMACS Prodigy, может быть связано с отличающимися условиями культивации: наличие шейкера, более частая смена среды и, как следствие, поддержание более стабильной концентрации IL-7 и IL-15 в CliniMACS Prodigy. Кроме того, более длительный цикл культивирования в системе G-Rex также может влиять на Tcm/Tem в анти-CD19-БМКП. Помимо преобладания Tcm-популяции в анти-CD19-БМКП мы наблюдали низкую экспрессию маркеров, ассоциированных с истощением Т-лимфоцитов, CD279, TIGIT при производстве с помощью обеих платформ, что, по ранее опубликованным данным, положительно влияет на последующую CAR-T-терапию [26, 27]. Известно, что наличие маркеров CD279 и TIGIT связано с дисфункциональным фенотипом Т-лимфоцитов, поэтому их повышенная экспрессия на CAR-T-клетках может привести к снижению эффективности терапии [26, 27].

Оценка специфичности анти-CD19-БМКП показала, что все CAR-T-лимфоциты, произведенные с помощью платформ CliniMACS Prodigy и G-Rex, проявляли таргетные свойства (экспрессировали CD107a и продуцировали цитокины) в отношении CD19-экспрессирующей клеточной линии Jeko-1. Однако функциональная активность продуктов, произведенных с помощью платформ CliniMACS Prodigy, была значительно выше. В работе F. Zhu и соавт. [16] упоминается о более низком проценте трансдуцированных клеток, а также сниженной функциональной активности CAR-T-клеточных продуктов, произведенных с использованием системы G-Rex по сравнению с CliniMACS Prodigy. В нашем исследовании мы наблюдаем те же эффекты, что может быть связано с особенностями режимов клеточного культивирования в этих системах. Более высокая доля дегранулирующих CAR-T-лимфоцитов после 7-дневного производственного цикла в CliniMACS Prodigy по сравнению с G-Rex процессами, длящимися 9 дней, может отражать более раннюю кинетику созревания эффекторов после активации Т-лимфоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше исследование показало, что системы CliniMACS Prodigy и G-Rex представляют собой

надежные платформы, которые можно использовать для производства высококачественных анти-CD19-БМКП в местах оказания медицинской помощи. Несмотря на имеющиеся различия, все полученные БМКП, вне зависимости от выбора платформы, демонстрировали удовлетворительные характеристики. Исходя из предполагаемых к использованию доз ($\sim 0,1-1 \times 10^6$ CAR-T-лимфоцитов), производство в бioreакторе G-Rex представляется экономически более выгодным и доступным, так как требует меньшего расхода реагентов. Однако производство с помощью неавтоматизированной платформы более трудозатратно и требует усиления надзора со стороны системы контроля качества.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Malakhova E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7334-0706>
Pershin D.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6148-7209>
Vedmedskaya V.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7247-4844>
Fadeeva M.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6553-2505>
Kulakovskaya E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9639-2779>
Lodoeva O.B. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2874-0014>
Sozonova T.A. ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-0057-2727>
Musaeva E.Ya. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0581-9472>
Muzalevsky Ya.O. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3513-8299>
Kazachenok A.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0497-9175>
Belchikov V.E. ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-7491-6906>
Melkova A.K. ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-3801-0931>
Shelikhova L.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0520-5630>
Molostova O.O. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2247-9337>
Badrin E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8678-9705>
Maschan M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1735-0093>

Литература / References

1. Rotte A., Frigault M.J., Ansari A., Gliner B., Heery C., Shah B. Dose-response correlation for CAR-T cells: a systematic review of clinical studies. *J Immunother Cancer* 2022; 10 (12): e005678.
2. Albinger N., Hartmann J., Ullrich E. Current status and perspective of CAR-T and CAR-NK cell therapy trials in Germany. *Gene Ther* 2021; 28 (9): 513–27.
3. Liu E., Marin D., Banerjee P., Macapinlac H.A., Thompson P., Basar R., et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med* 2020; 382 (6): 545–53.
4. Saura-Esteller J., de Jong M., King L.A., Ensing E., Winograd B., de Gruijl T.D., et al. Gamma Delta T-Cell Based Cancer Immunotherapy: Past-Present-Future. *Front Immunol* 2022; 13: 915837.
5. Hadiloo K., Tahmasebi S., Esmaeilzadeh A. CAR-NKT cell therapy: a new promising paradigm of cancer immunotherapy. *Cancer Cell Int* 2023; 23 (1): 86.
6. Pan K., Farrukh H., Chittepu V.C.S.R., Xu H., Pan C., Zhu Z. CAR race to cancer immunotherapy: from CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2022; 41 (1): 119.
7. Chen Y.-J., Abila B., Mostafa Kamel Y. CAR-T: What Is Next? *Cancers (Basel)* 2023; 15 (3): 663.
8. Awasthi R., Maier H.J., Zhang J., Lim S. Kymriah® (tisagenlecleucel) – An overview of the clinical development journey of the first approved CAR-T therapy. *Hum Vaccin Immunother* 2023; 19 (1): 2210046.
9. Papadoulis I., Mueller-Berghaus J., Beuneu C., Ali S., Hofner B., Petavy F., et al. EMA Review of Axicabtagene Ciloleucel (Yescarta) for the Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Oncologist* 2020; 25 (10): 894–902.
10. Arcangeli S., Falcone L., Camisa B., De Girardi F., Biondi M., Giglio F., et al. Next-Generation Manufacturing Protocols Enriching TSCM CAR T Cells Can Overcome Disease-Specific T Cell Defects in Cancer Patients. *Front Immunol* 2020; 11: 1217.
11. Erdoğan E., Yalçın K., Hemşinlioğlu C., Sezgin A., Seyis U., Kançağı D.D., et al. Preliminary Report of the Academic CAR-T (ISIKOK-19) Cell Clinical Trial in Turkey: Characterization of Product and Outcomes of Clinical Application. *Turk J Haematol* 2022; 39 (3): 206–10.
12. Ganeeva I., Zmievskaya E., Valiullina A., Kudriaeva A., Miftakhova R., Rybalov A., et al. Recent Advances in the Development of Bioreactors for Manufacturing of Adoptive Cell Immunotherapies.

- Bioengineering (Basel) 2022;9 (12): 808.
13. Mock U., Nickolay L., Philip B., Cheung GW-K., Zhan H., Johnston I.C.D., et al. Automated manufacturing of chimeric antigen receptor T cells for adoptive immunotherapy using CliniMACS prodigy. *Cytotherapy* 2016; 18 (8): 1002–11.
 14. Gee AP. GMP CAR-T cell production. *Best Pract Res Clin Haematol* 2018; 31 (2): 126–34.
 15. Castella M., Boronat A., Martín-Ibáñez R., Rodríguez V., Suñé G., Caballero M., et al. Development of a Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor: A Paradigm for an Affordable CAR T Cell Production at Academic Institutions. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2019; 12: 134–44.
 16. Zhu F., Shah N., Xu H., Schneider D., Orentas R., Dropulic B., et al. Closed-system manufacturing of CD19 and dual-targeted CD20/19 chimeric antigen receptor T cells using the CliniMACS Prodigy device at an academic medical center. *Cytotherapy* 2018; 20 (3): 394–406.
 17. 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 (1): 7200.
 18. Bajgain P., Mucharla R., Wilson J., Welch D., Anurathan U., Liang B., et al. Optimizing the production of suspension cells using the G-Rex “M” series. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2014; 1: 14015.
 19. Gagliardi C., Khalil M., Foster A.E. Streamlined production of genetically modified T cells with activation, transduction and expansion in closed-system G-Rex bioreactors. *Cytotherapy* 2019; 21 (12): 1246–57.
 20. Song H.W., Somerville R.P., Stroncek D.F., Highfill S.L. Scaling up and scaling out: Advances and challenges in manufacturing engineered T cell therapies. *Int Rev Immunol* 2022; 41 (6): 638–48.
 21. 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; S1465324924000677.
 22. Sahin I., Erturk A., De Souza A., Pamarthi S., Tavora F., Giles F.J., et al. Glycogen synthase kinase-3 beta inhibitors as novel cancer treatments and modulators of antitumor immune responses. *Cancer Biol Ther* 2019; 20 (8): 1047–56.
 23. Sommermeyer D., Hudecek M., Kosasih P.L., Gogishvili T., Maloney D.G., Turtle C.J., et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8⁺ and CD4⁺ subsets confer superior antitumor reactivity *in vivo*. *Leukemia* 2016; 30 (2): 492–500.
 24. Castella M., Caballero-Baños M., Ortiz-Maldonado V., González-Navarro E.A., Suñé G., Antón-Vidósola A., et al. Point-Of-Care CAR T-Cell Production (ARI-0001) Using a Closed Semi-automatic Bioreactor: Experience From an Academic Phase I Clinical Trial. *Front Immunol* 2020; 11: 482.
 25. Kawalekar O.U., O'Connor R.S., Fraietta J.A., Guo L., McGettigan S.E., Posey A.D., et al. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity* 2016; 44 (2): 380–90.
 26. Josefsson S.E., Beiske K., Blaker Y.N., Førstund M.S., Holte H., Østenstad B., et al. TIGIT and PD-1 Mark Intratumoral T Cells with Reduced Effector Function in B-cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Immunol Res* 2019; 7 (3): 355–62.
 27. Jackson Z., Hong C., Schaner R., Dropulic B., Caimi P.F., de Lima M., et al. Sequential Single-Cell Transcriptional and Protein Marker Profiling Reveals TIGIT as a Marker of CD19 CAR-T Cell Dysfunction in Patients with Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Discov* 2022; 12 (8): 1886–903.