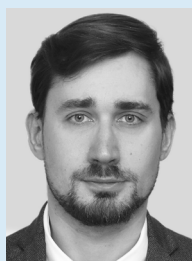


CAR-T-терапия: сегодня и завтра



Татьяна Дорошенко,
заведующий отделением клеточных технологий Республиканской молекулярно-генетической лаборатории канцерогенеза РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, кандидат биологических наук, доцент



Дмитрий Дормешкин,
ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики биотехнологий Института биоорганической химии НАН Беларуси, кандидат химических наук, доцент



Сергей Красный,
заместитель директора по научной работе РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, доктор медицинских наук, академик

CAR-T-терапия, ставшая настоящим прорывом в онкологии, – это генно-инженерный клеточный метод, при котором собственные Т-лимфоциты пациента выделяются и генетически изменяются для распознавания антигенов на поверхности злокачественных опухолевых клеток и их уничтожения. На сегодняшний день существует 7 CAR-T-клеточных продуктов для официального применения в онкогематологии: 5 – для лечения В-клеточных острого лимфобластного лейкоза и лимфом, 2 – множественной миеломы. Активно развиваются методы лечения аутоиммунных заболеваний, в частности системной красной волчанки, с использованием анти-CD19 CAR-T [1]. Стоимость подобной коммерческой терапии в мире стартует от 350 тыс. долл. Эксперты прогнозируют устойчивые темпы роста рынка CAR-T – не менее 20% каждый год. В текущий период проходит более 1 тыс. клинических испытаний данной методики, из них более половины связаны с воздействием на солидные опухоли.

Концепция CAR (chimeric antigen receptor), химерного Т-клеточного рецептора, который комбинирует в своем составе переменные области антител, ответственные за распознавание антигена, и константные области

Т-клеточного рецептора, обеспечивающие передачу сигнала и активацию каскада клеточных реакций, была впервые представлена в 1987 г. японским иммунологом Ёсикадзу Куросава и его командой из Института комплексной медицинской науки в Эйти, Япония [2]. 2 года спустя, в 1989 г., израильский иммунолог доктор Зелен Ешхар и его коллеги из Института наук Вейцмана создали первый CAR на основе варибельной легкой и тяжелой цепей антитела против 2,4,6-тринитрофенила, которые соединили с константными участками α - и β -цепей Т-клеточного рецептора [3].

Первые испытания CAR-T были проведены в 2010 г. на двух пациентах с рефрактерным хроническим лимфолейкозом [4]: один из них до сих пор в ремиссии, второй умер от инфекции COVID-19, также находясь в ремиссии. В реальную клиническую практику CAR-T вошла в 2017 г. Первыми клеточными препаратами, получившими одобрение Управления по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA), были тисагенлеклейсел (Kymriah, производитель – «Новартис») и аксикабтаген цилолейсел (Yescarta, «Гилеад»), CAR Т-клетки, нацеленные на CD19 для лечения В-клеточных лейкозов [4].

Изготовление CAR-T-клеточного продукта

Этот сложный процесс занимает 10–14 дней и включает в себя следующие этапы:

- культивирование бактерий и получение плазмид;
- наработку и очистку лентивирусных частиц, несущих генетическую информацию химерного антигенного рецептора (CAR);
- выделение Т-лимфоцитов из продукта афереза пациента, разделение их на фракции, активацию;
- лентивирусную трансдукцию;
- наработку терапевтической дозы клеток;
- контроль качества;
- криоконсервацию;
- формуляцию;
- введение пациенту (рис. 1) [5, 6].

Затем еще 7 дней требуются для контроля стерильности – это необходимый параметр, наравне с высокой жизнеспособностью культуры и наличием генетической модификации (введения CAR в Т-лимфоциты пациента, что делает их живым лекарством). Химерная природа рецепторов обусловлена сочетанием в одной молекуле функций активации Т-клеток и специфического связывания с антигеном безотносительно молекул главного комплекса гистосовместимости, что позволяет им не зависеть от антиген-презентирующей клетки, в отличие от ситуации нативного Т-клеточного иммунного ответа [1, 5, 6].

CAR в своей структуре содержит все элементы для распознавания антигена, активации лимфоцита, стимуляции деления и передачи сигнала для осуществле-

ния противоопухолевых эффекторных функций – высвобождения перфоринов, гранзима В, синтеза цитокинов и, как следствие, уничтожения опухолевой клетки – носителя антигена. Стандартная конструкция CAR состоит из внеклеточного домена (эктодомена), трансмембранного домена и домена внутриклеточной активации Т-клеток (энтодомена) (рис. 2а) [5–7]. Внеклеточный связывающий домен, как правило, представляет собой одноцепочечные вариабельные фрагменты иммуноглобулинов scFv (single chain variable fragment), включающие вариабельные области легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей, ковалентно связанных линкером. Он необходим для узнавания опухолевого антигена и обеспечивает специфичность взаимодействия с ним. Эктодомен связан гибким шарнирным фрагментом, придающим рецептору подвижность, с трансмембранным доменом, который необходим для закрепления химерного рецептора на поверхности клетки. Внутриклеточный

сигнальный домен содержит 2 элемента: костимулирующие домены, которые могут быть включены в конструкцию (CD28, 4-1BB, ICOS, CD27, OX40) и дополнительно активируют работу Т-лимфоцитов, продлевая срок их персистенции в организме пациента, и ζ-цепь (дзета-цепь) CD3 (CD3ζ), отвечающую за активацию CD8+ Т-лимфоцитов, их пролиферацию и синтез перфоринов и гранзимов, участвующих в уничтожении опухолевых клеток. Уже создано несколько поколений CAR на основе стандартной конфигурации.

Разделение химерных лимфоцитов на поколения определяется составом внутриклеточных сигнальных доменов, включенных в молекулу химерного рецептора. В настоящее время выделяют их 5 поколений (рис. 2б), [1, 6, 7]. Все имеющиеся в клинической практике CAR-T относятся ко 2-му, и они хорошо работают в онкогематологии. В то же время в большинстве идущих клинических испытаний против солидных опухолей задействованы варианты

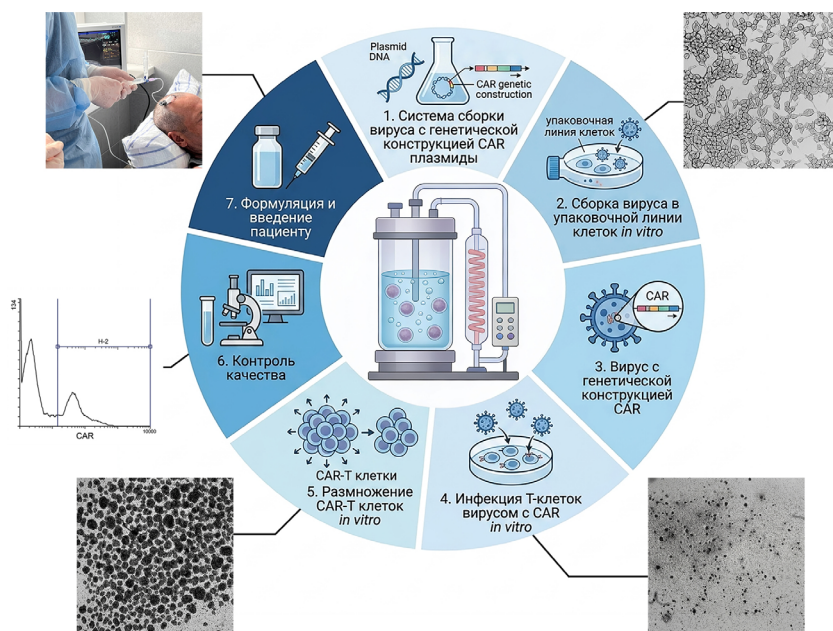


Рис. 1. Схема производства CAR-T-лимфоцитов

4-го поколения, которые содержат дополнительный ген, улучшающий свойства CAR-T-лимфоцита, например Т-тропный цитокин (рис. 2б). В доклинических моделях эта особенность значительно повышала эффективность CAR-T-клеточной терапии по сравнению с CAR 2-го поколения [5, 8].

Применение метода в Беларуси

В РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова применение CAR-T-терапии началось в 2021 г., уже изготовлено 115 доз CAR-T и пролечено более 100 пациентов, из которых 9 – с множественной миеломой, 1 – с системной красной волчанкой, остальные – с В-клеточными лимфомами. Важно, что обе генетические конструкции (анти-CD19 и анти-BCMA) и технологии получения CAR-T-лимфоцитов – отечественные разработки, что позволяет больным получать инновационное лечение в Беларуси бесплатно, в то время как во многих соседних странах Европы оно пока не доступно даже на коммерческой основе [9].

Молекула CD19 – удачная мишень для воздействия CAR-T-лимфоцитов, она представлена на опухолевых клетках В-клеточных лейкозов и лимфом, а из здоровых клеток – только на зрелых В-лимфоцитах, функции которых могут быть легко восполнены [10].

У всех пациентов, прошедших CAR-T-терапию, возможности иного лечения были признаны исчерпанными, прогнозируемая продолжительность жизни составляла не более 2–3 месяцев. На рис. 3а представлены результаты анти-CD19 CAR-T-терапии диффузной крупноклеточной

В-клеточной лимфомы (ДБККЛ): общая четырехгодичная выживаемость (ОВ) составила 67%, бессобытийная выживаемость (БВ) – 46,2%. Это свидетельствует о том, что предложенный нами метод по эффективности сопоставим или она выше, чем у зарубежных коммерческих аналогов. Так, в мультицентровом проспективном исследовании трех CAR-T (axi-cell, liso-cell, tisa-cell) для лечения аналогичной группы пациентов четырехгодичная ОВ составила от 52 до 35%, БВ – от 40 до 21% [11].

Клинический пример эффективности нашей терапии приведен на рис. 3б. Пациент, мужчина 38 лет, заболел в ноябре 2020 г., диагноз: диффузная В-клеточная лимфома, ДБККЛ, non-GCB подтип с поражением мягких тканей основания черепа, лимфоузлов шеи, C1-2 позвонков, IV ст., рефрактерное течение. После исчерпания всех опций терапии и прогрессирования заболевания ему по решению консилиума была назначена анти-CD19

CAR-T-терапия. Клеточный продукт был введен в сентябре 2021 г. Спустя месяц по данным ПЭТ-КТ наблюдалась положительная динамика, через полгода – полный метаболический ответ. Пациент находится в ремиссии по настоящее время.

Сложности и пути их преодоления

CAR-T-терапия пока не вошла в клиническую практику лечения солидных онкозаболеваний из-за наличия определенных ограничений. К ним относятся:

- небольшое количество опухолевоспецифических маркеров, которые могут быть использованы в качестве мишеней для CAR-T-клеток. Эти маркеры могут также экспрессироваться на клетках здоровых тканей, что создает риск нежелательной токсичности и требует тщательного подхода к выбору целевого антигена;
- генетическая разнородность и пластичность солидных опухолей могут затруднять выбор специфических антигенов CAR-T-клеток. Для преодоления этого необходимо применение нескольких мишеней одновременно или последовательно;

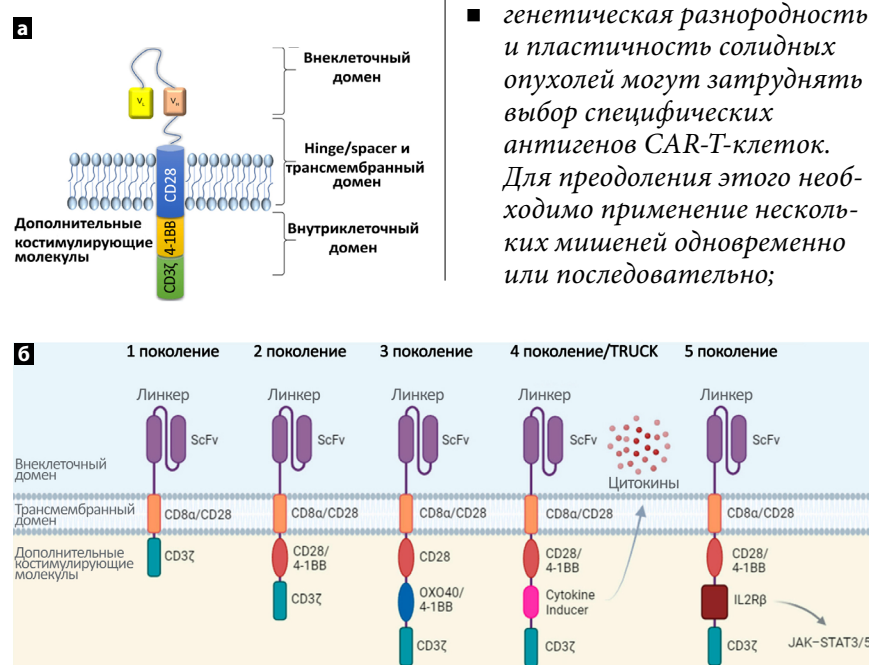


Рис. 2. Структура CAR (а) и поколения химерного антигенного рецептора (б)

- низкая эффективность миграции CAR-T-клеток в ткани опухоли, что может привести к истощению данных клеток и их анергии. Избежать этого можно путем введения в конструкцию хоуминг-цитокинов, направляющих миграцию в нужные органы, например лимфоузлы;
- действие иммуносупрессивного микроокружения, которое приводит к истощению CAR-T-клеток и их анергии – выходом может стать подавление ингибирующих сигналов от опухоли и микроокружения, превращение их в активирующие.

Принимая во внимание все эти аспекты, специалистами РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова и Института биоорганической химии НАН Беларуси было решено в рамках научного проекта создать CAR-T-лимфоциты 4-го поколения, несущие химерный антигенный рецептор, направленный к опухолевым белкам ROR1 или мезотелину, с потенциалом терапии солидных и части онкогематологических опухолей около 70%.

ROR1 – онкофетальный белок, экспрессируется в основном в эмбриональных клетках, активируя сигнальные пути для пролиферации, выживания и миграции клеток, наиболее изученный из которых – неканонический сигнальный путь WNT [12]. В нормальных тканях он представлен главным образом в адипоцитах, но проявляется в широком спектре опухолевых клеток (хронический и острый лейкоз, В-лимфомы, рак легкого, яичников, эндометрия, желудка, поджелудочной железы, колоректальный, трижды негативный рак молочной железы, мела-

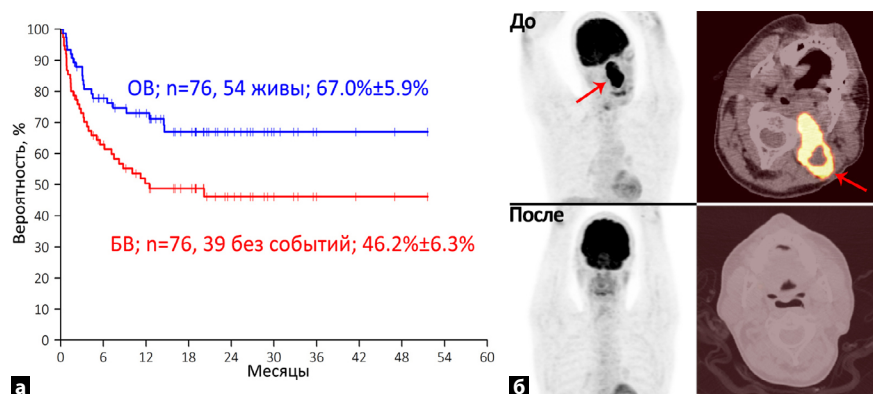


Рис. 3. Результаты анти-CD19 CAR-T-терапии диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДБКЛ): а – общая и бессобытийная выживаемость у пациентов с ДБКЛ, б – клинический пример эффективности CAR-T-терапии

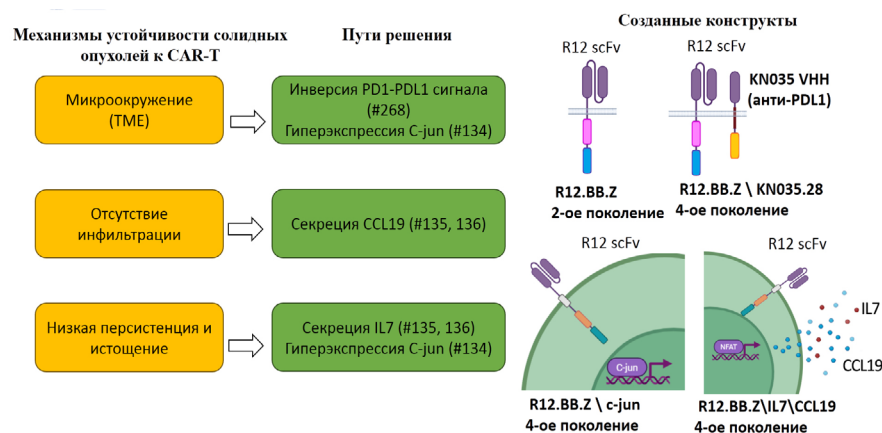


Рис. 4. Механизмы устойчивости опухолевых клеток к CAR-T-терапии и предложенные нами пути преодоления

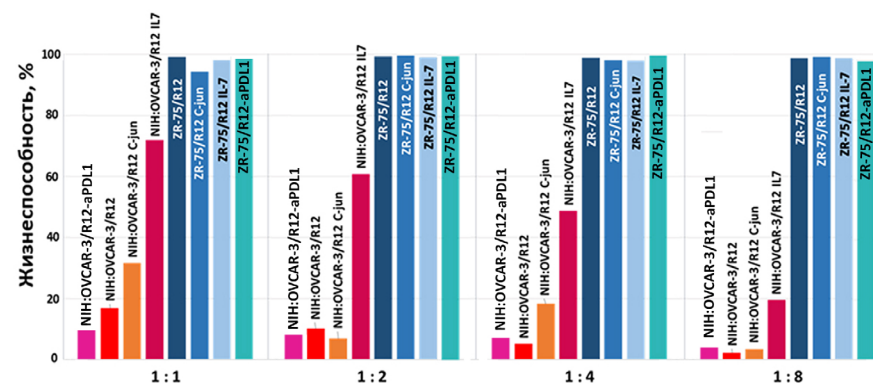


Рис. 5. Цитотоксический тест анти-ROR1 CAR-T-лимфоцитов 2-го и 4-го поколений с клеточной линией, экспрессирующей ROR1 (NIH:OVCAR-3, аденокарцинома яичников) и контрольной, не экспрессирующей (ZR-75, рак молочной железы) при различном соотношении мишень:эффектор (от 1:1 до 1:8). Представлены данные среднего из дуплета, аналогичные результаты получены в 3 независимых экспериментах

нома, мезотелиома и др.), при этом его высокая экспрессия коррелирует с плохой общей выживаемостью онкологических пациентов [13, 14]. ROR1 рассматривают как маркер стволовых опухолевых клеток и, соответственно, как возможную мишень прицельного воздействия на них. Особенно это актуально для глиобластомы – наиболее агрессивной опухоли, для терапии которой на сегодняшний день нет эффективных методов [15–17]. Учитывая это, мы создали конструкции CAR 2-го и 4-го поколений на основе охарактеризованного кроличьего антитела R12, направленного к внеклеточному домену молекулы ROR1, которые:

- гиперэкспрессируют *c-Jun* (транскрипционный фактор), что усиливает функциональность CAR-T-клеток и их устойчивость к истощению и особенно важно при таргетинге солидных опухолей;
- экспрессируют *CCL19* и *ИЛ-7*, что направлено на преодоление двух важнейших ограничений терапии солидных опухолей: плохой инфильтрации Т-клеток в опухоль и недостаточной поддержки их выживания и пролиферации;

■ содержат анти-PD-L1 инвертированный рецептор, сочетающий внеклеточную часть PD-1 или анти-PD-L1 антитело и внутриклеточный домен CD28; это позволяет преобразовать ингибирующий сигнал в активирующий, усиливая функцию CAR-T-клеток в условиях иммунного подавления, что способствует повышению пролиферации, выработке цитокинов и устойчивости к истощению Т-клеток (рис. 4).

Нами были наработаны CAR-T-лимфоциты 2-го и 4-го поколений на основе этих конструкций и проведен цитотоксический тест для характеристики их противоопухолевой активности против клеточной линии, экспрессирующей ROR1 (NIH:OVCAR-3, аденокарцинома яичников), и контрольных, не экспрессирующих его (ZR-75, рак молочной железы), при различном соотношении «мишень:эффектор» (от 1:1 до 1:8) (рис. 5). Лимфоциты проявили высокую специфическую цитотоксичность против ROR1-позитивных клеток, но не контрольной линии.

Следующая выбранная нами мишень – мезотелин. Его экспрессия в норме ограничена клетками выстилки перикарда, брюшины и плевральной полости. Однако многие типы опухолей (100% мезотелиом, до 100% опухолей поджелудочной железы, до 70% рака яичников и ТНРМЖ, часть опухолей желчевыводящих путей, рака желудка, глиом и т.д.) характеризуются высоким его содержанием на поверхности клеток [18], так как белок вовлечен в процессы пролиферации, метастазирования, выживания и химиорезистентности раковых клеток. Высокая его экспрессия, как правило, ассоциирована с плохим прогнозом [18, 19].

В данный период проходят 19 действующих клинических испытаний антимезотелина CAR-T в онкологии (ClinicalTrials.gov). Продemonстрирован приемлемый уровень побочных явлений и переносимости лечения.

Для получения CAR-T-лимфоцитов к мезотелину были сконструированы CAR 2-го поколения на основе 3 различных антител, отличающихся эпитопной специфичностью (MORab, hYP218 и 15B6), что может быть важно,

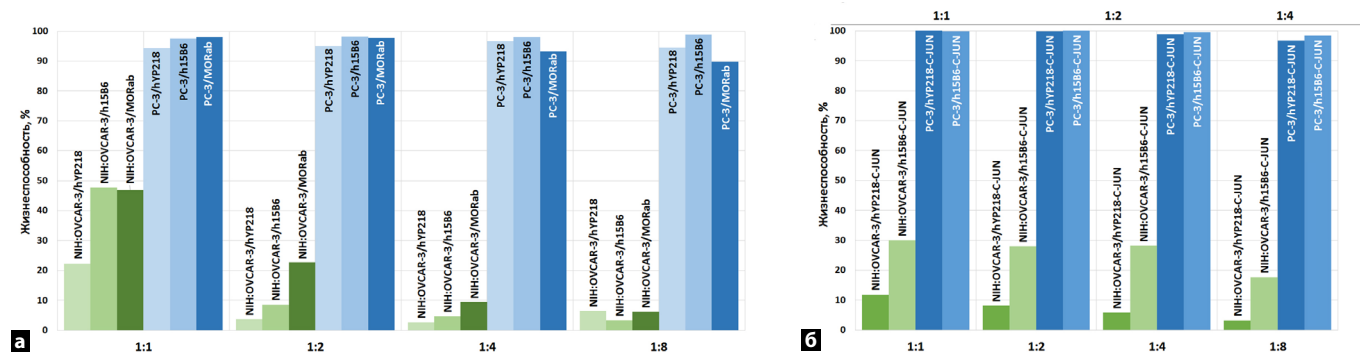


Рис. 6. Цитотоксический тест анти-мезотелин CAR-T-лимфоцитов 2-го и 4-го поколений с клеточной линией, экспрессирующей мезотелин (NIH:OVCAR-3, аденокарцинома яичников) и контрольной, не экспрессирующей (PC3, рак предстательной железы) при различном соотношении мишень:эффектор (от 1:1 до 1:8): а – цитотоксический тест с CAR-T-лимфоцитами 2-го поколения на основе 3 различных антител к мезотелину; б – цитотоксический тест с CAR-T-лимфоцитами 4-го поколения, содержащими дополнительный ген конститутивно экспрессирующегося транскрипционного фактора *c-jun*. Представлены данные среднего из дуплета, аналогичные результаты получены в 3 независимых экспериментах

так как мезотелин способен подвергаться шеддингу с образованием растворимых форм, которые также будут связываться с лимфоцитами и препятствовать взаимодействию с опухолевыми клетками.

Для оценки противоопухолевой активности мы получили CAR-T-лимфоциты здоровых доноров на основе трех конструкций и осуществили цитотоксический тест *in vitro* с двумя опухолевыми клеточными линиями – с экспрессией мезотелина на мембране (рак яичников OVCAR3) и не несущей мезотелин (отрицательный контроль, линия рака простаты PC3). Результаты представлены на рис. 6а: при всех использованных соотношениях «мишень:эффектор» CAR-T-лимфоциты на основе трех антител показали высокую специфическую активность против мезотелин-экспрессирующей клеточной линии.

Для преодоления влияния опухолевого микроокружения нами были созданы CAR 4-го поколения, содержащие дополнительный ген конститутивно экспрессирующегося транскрипционного фактора c-jun, который улучшает выживаемость и функциональность лимфоцитов, и изучили их свойства в цитотоксическом тесте с теми же клетками (рис. 6б): CAR-T-лимфоциты 4-го поколения также проявляют специфическое действие против мишеней, несущих мезотелин. Активация цитотоксических свойств лимфоцитов сопровождалась синтезом Т-тропных цитокинов интерферона-гамма и ИЛ-2.

Для последующего перехода к клиническим испытаниям анти-мезотелин и анти-ROR1 CAR-T-терапии необходимы дополнительные доклинические исследования *in vivo* на животных моделях опухолей человека.

Таким образом, CAR-T, произведенные в РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова совместно со специалистами Института биоорганической химии НАН Беларуси, показали свою высокую эффективность при лечении В-клеточных лимфом, сопоставимую с коммерческими аналогами.

При разработке CAR-T-терапии против солидных опухолей необходимо решать ряд дополнительных задач: ингибирующее влияние опухолевого микроокружения, низкая инфильтрация опухоли, анергия и низкая персистенция лимфоцитов, что может быть достигнуто гиперэкспрессией фактора c-jun, секрецией цитокинов IL-7, CCL19, инверсией PD1-PDL1 сигнала.

Полученные нами CAR-T-лимфоциты к ROR1 и мезотелину обладают выраженным специфическим цитотоксическим действием против опухолевых клеток, экспрессирующих ROR1 и мезотелин *in vitro*. Разрабатываемая нами терапия обладает потенциалом терапии широкого круга онкологических и гематологических заболеваний. ■

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. CAR-T cell therapy for cancer: current challenges and future directions / I. Zugasti, L. Espinosa-Aroca, K. Fidy / Signal Transduct Target Ther. 2025. Jul №4 10(1) P. 210. DOI: 10.1038/s41392-025-02269-w/.
2. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived c regions / Y. Kuwana, Y. Asakura, N. Utsunomiya [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. 1987. №149. P. 960–968. DOI: 10.1016/0006-291X(87)90502-X.
3. Gross G. Expression of immunoglobulin-t-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity / G. Gross, T. Waks, Z. Eshhar // Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1989. №86. P. 10024–10028. DOI: 10.1073/pnas.86.24.10024.
4. From bench to bedside: the history and progress of CAR T cell therapy / A. Mitra, A. Barua, L. Huang [et al.] // Front Immunol. 2023. №15. P. 1188049. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1188049.

5. T Current updates on generations, approvals, and clinical trials of CAR T-cell therapy / Asmamaw Dejenie, G. Tiruneh M. Medhin [et al.] // Hum Vaccin Immunother. 2022. №18(6). P. 2114254. DOI: 10.1080/21645515.2022.2114254.
6. CAR-T cell manufacturing: Major process parameters and next-generation strategies / M. Ayala Ceja, M. Khericha, C. M. Harris [et al.] // J Exp Med. 2024. №221(2). P. e20230903. DOI: 10.1084/jem.20230903.
7. Sterner R.C. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies / R. C Sterner, R. M. Sterner // Blood Cancer J. 2021. №11(4). P. 69. DOI: 10.1038/s41408-021-00459-7.
8. Alsaiedi A.A. Tracing the development of CAR-T cell design: from concept to next-generation platforms / A.A. Alsaiedi, K.A. Zaher // Front. Immunol. 2025. №16. P. 1615212. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1615212.
9. The European CAR-T map-Current status and future directions to improve access to CAR T-cell therapy for hematologic malignancies / E.R. Pennings, F.W. Thielen, F. Broussais [et al.] // Hemasphere. 2026. №10(3). P. e70306. DOI: 10.1002/hem3.70306.
10. Hill J.A. CAR-T – and a side order of IgG, to go? Immunoglobulin replacement in patients receiving CAR-T cell therapy / J.A. Hill, S. Giralt, T.R. Torgerson, H.M. Lazarus // Blood Rev. 2019. №38. P. 100596. DOI: 10.1016/j.blre.2019.100596.
11. Comparative real-world outcomes of CD19-directed CAR T-cell therapies in large B-cell lymphoma / X. Deschênes-Simard, M. Bromberg, S.M. Devlin [et al.] // Blood Adv. 2025. №9 (21). P. 5571–5584. DOI: 10.1182/.
12. Tyrosine Kinase ROR1 as a Target for Anti-Cancer Therapies / Y. Zhao, D. Zhang, Y. Guo [et al.] // Front. Oncol. 2021. №11. P. 680834. DOI: 10.3389/fonc.2021.680834.
13. Rebagay G. ROR1 and ROR2 in Human Malignancies: Potentials for Targeted Therapy / G. Rebagay, S. Yan, C. Liu and N.K. Cheung // Front. Oncol. 2012. №2. P. 34. DOI: 10.3389/fonc.2012.00034.
14. Therapeutic advances in the targeting of ROR1 in hematological cancers / A.B. Tigu, R. Munteanu, C. Moldovan [et al.] // Cell Death Discov. 2024. №10(1). P. 471. DOI: 10.1038/s41420-024-02239-1.
15. Lin W. IGFBP5 is an ROR1 ligand promoting glioblastoma invasion via ROR1/HER2-CREB signaling axis / W. Lin, R. Niu, S.M. Park [et al.] // Nat Commun. 2023. №14(1). P. 1578. DOI: 10.1038/s41467-023-37306-1.
16. Zhu H. ROR1 facilitates glioblastoma growth via stabilizing GRB2 to promote c-Fos expression in glioma stem cells / H. Zhu, L. Cheng, D. Liu [et al.] // Neuro Oncol. 2025. № 27(3). P. 695–710. DOI: 10.1093/neuonc/noae224.
17. Jung M.S. The Role of Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptor 1 (ROR1) in Cancer Stem Cell Signaling / M.S. Jung, W.Y. Choi, W. Zhang [et al.] // Int J Mol Sci. 2025. №26(16). P. 7828. DOI: 10.3390/ijms26167828. PMID: 40869147; PMCID: PMC12386924.
18. Faust J.R. Mesothelin: An Immunotherapeutic Target beyond Solid Tumors / J.R. Faust, D. Hamill, E.A. Kolb [et al.] // Cancers. 2022. №14. P. 1550. https://doi.org/10.3390/cancers14061550.
19. Boisgard R. Mesothelin biology and the evolving landscape of targeted immunotherapy / R. Boisgard, P. Chames, B. Kerfelec // Molecular Therapy Oncology. 2026. №34. P. 1–6.