

НОВЫЕ БИМЕДИЦИНСКИЕ КЛЕТОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

УДК: 57.085.23+ 615.375:[616.006.04:616-004.9:616.43]

Аннотация. Клеточная терапия стремительно развивается во всем мире, а перечень заболеваний различной этиологии, которые лечат с помощью биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), постоянно растет. С открытием в 2021 г. Центра иммунологии и аллергологии сотрудники Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ИБКИ) совместно с коллегами из Белорусского государственного медицинского университета (БГМУ) начали разработку БМКП для коррекции иммунопатологических состояний. Разработаны технологии получения БМКП на основе цитокин-индуцированных киллерных клеток для лечения онкозаболеваний урогенитальной сферы, толерогенных дендритных клеток для терапии сахарного диабета 1-го типа, регуляторных Т-лимфоцитов для борьбы с системным склерозом.

Ключевые слова: клеточная терапия, биомедицинский клеточный продукт, иммунотерапия, цитокин-индуцированные киллерные клетки, Т-регуляторные клетки, толерогенные дендритные клетки.

Для цитирования: Антонец Н., Гончаров А., Тимохина О., Рында Е., Минич Я., Прохоров А., Мохорт Т., Чиж К. Новые биомедицинские клеточные продукты для иммунотерапии заболеваний человека // Наука и инновации. 2022. №2. С. 15–23.
<https://doi.org/10.29235/1818-9857-2022-2-15-23>



Лечение и профилактика заболеваний путем трансплантации клеток – биомедицинских клеточных продуктов – активно развивающееся направление медицины во всем мире. Согласно закону о здравоохранении Республики Беларусь, под БМКП подразумевают пересадачный материал, полученный на основе клеток человека, за исключением эмбриональных, фетальных стволовых и половых [1].

За последние 15 лет белорусскими учеными и врачами проделана колоссальная совместная работа по разработке БМКП и клиническим испытаниям, в рамках которых комплексно оценена переносимость, безопасность и эффективность новых методов клеточной терапии.

Доклинические исследования в данной области начались в нашей стране в 2000-х гг., первые клинические испытания проведены в 2007–2009 гг. Так, в БГМУ (Федулов А.С.) и МНПЦ хирургии, трансплантологии и гематологии (Усс А.Л.) изучали применение гемопоэтических стволовых клеток для лечения рассеянного склероза, в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Титов Л.П., Гончаров А.Е.) применяли дендритные клетки (ДК) в терапии хронического гепатита В.

Организации, подчиненные Национальной академии наук Беларуси, внесли существенный вклад в разработку БМКП. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси стоял у истоков применения клеточных технологий в нашей стране и на протяжении десятилетия развивал направление регенеративной медицины, для нужд которой разрабатывал БМКП на основе мезенхимальных стволовых клеток (МСК), фибробластов и кератиноцитов. Так, в 2010–2011 гг. совместно с БГМУ (научные руководители Третьяк С.И., Волотовский И.Д.) проведены клинические исследования по оценке эффективности МСК в лечении трофических язв. ИБКИ координировал программу Союзного государства «Разработка новых методов и технологий восстановительной терапии патологически измененных тканей и органов с использованием стволовых клеток» («Стволовые клетки», 2011–2013 гг.), успешное выполнение которой создало научную основу для технологий трансплантации БМКП и их применения при широком спектре заболеваний органов и систем.

Среди организаций, подчиненных Министерству здравоохранения Республики Беларусь, ведущими в области методов клеточной терапии являются РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, МНПЦ хирургии, трансплантологии и гематологии, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, БГМУ, БелМАПО, РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, РНПЦ травматологии и ортопедии, РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии, РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий.

По состоянию на январь 2022 г. в Государственном реестре БМКП Республики Беларусь имеется информация о 8 зарегистрированных клеточных продуктах. Среди них – 5 МСК, 1 – фибробласты дермы, 1 – тканевый эквивалент кожи, 1 – лимбальные стволовые клетки.

Министерством здравоохранения утверждено как минимум 62 инструкции по при-

менению, в которых изложены методы клеточной терапии широкого спектра заболеваний, что выводит нашу страну в первую десятку лидеров в данном направлении не только среди стран СНГ, но и в Европе [2].

В Беларуси использование аутологичных и аллогенных мезенхимальных стволовых клеток возможно:

- в трансплантологии при пересадке аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, костного мозга, РТПХ, трансплантации почки;
- в неврологии и нейрохирургии при рассеянном склерозе, боковом амиотрофическом склерозе, повреждении периферических нервов, эпилепсии, инсульте, болезни Паркинсона;
- в кардиологии при ишемических и не ишемических кардиомиопатиях;
- при повреждениях кожи и слизистых: трофических язвах, хронических стенозах трахеи/гортани, свищах прямой кишки;
- аутоиммунных заболеваний: системной красной волчанке, болезни Крона;
- при болезнях опорно-двигательного аппарата: дефектах хряща, кости, остеоартрозе;
- в пульмонологии при альвеолите, хронической обструктивной болезни легких;
- в стоматологии при рецессии десны и хроническом периодонтите;
- в гинекологии и репродуктивной медицине при послеоперационных рубцах матки, внутриматочных синехиях;
- в инфектологии при мультирезистентном туберкулезе, гепатите С, внебольничных пневмониях, вызванных вирусом SARS-CoV-2.

В соавторстве с врачами сотрудники Института биофизики и клеточной инженерии приняли участие в разработке 21 инструкции по применению, что составляет 34% от их общего количества.

Адьювантная иммунотерапия с использованием ДК применяется в лечении рака молочной железы, поджелудочной железы, мочевого пузыря, иных химиорезистентных опухолей, а также туберкулеза легких и хронического гепатита В (7 инструкций по применению).

Активно используются фибробласты и кератиноциты кожи, лимбальные и МСК. Так, разработаны методы лечения ожогов, длительно не заживающих ран, рубцов и возрастной атрофии кожи с помощью БМКП на основе фибробластов дермы (4 инструкции по применению). В офтальмологии разработан метод борьбы с кератитами и дистрофиями роговицы аутологичными лимбаль-

ными стволовыми клетками и МСК жировой ткани (1 инструкция по применению). В оториноларингологии для терапии хронических стенозов трахеи и гортани используют аутологичные МСК обонятельной выстилки (1 инструкция по применению). Для лечения системной красной волчанки и внебольничных пневмоний, вызванных вирусом SARS-CoV-2, используют БМКП на основе пулированных МСК обонятельной выстилки (2 инструкции по применению), при рецессии десны – смесь аутологичной МСК жировой ткани с коллагеновым гелем (7%) (1 инструкция по применению). Также разработан метод лечения хронического периодонтита с помощью аутологичных МСК жировой ткани, индуцированных к дифференцировке в остеогенном направлении (1 инструкция по применению). Способ терапии с помощью МСК жировой ткани разработан также для борьбы с урологическими и гинекологическими заболеваниями (недержание мочи, внутриматочные синехии, послеоперационные рубцы матки) (4 инструкции по применению).

Институт получил 4 свидетельства о регистрации БМКП, еще 3 продукта находятся на заключительной стадии государственной регистрации [3]. Разработки активно внедряются в практику. Так, в Отделении клеточной терапии Института ежегодно проходят лечение с применением клеточных технологий более 100 пациентов.

В ближайшие годы интерес к новым методам лечения будет возрастать, и на белорусском рынке появятся новые БМКП. В настоящее время выполняются перспективные исследования, направленные на разработку БМКП и методов лечения на основе генетически модифицированных клеток: индуцированных плюрипотентных клеток (ИБКИ), Т-лимфоцитов с химерным антигенным рецептором (CAR-Т-терапия) (РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии), генетически модифицированных ДК (ИБКИ, РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий) и др. В рамках действующего законодательства БМКП на основе генетически модифицированных клеток человека подлежат государственной регистрации после доказательства их безопасности на этапе доклинических исследований на моделях, максимально отражающих патогенез и набор симптомов и синдромов заболевания (патологического состояния) [1].

Несмотря на впечатляющие достижения в области клеточной терапии в Беларуси, возможности использования разных типов клеток,

не подвергавшихся генетической модификации, до сих пор не исчерпаны. Начиная с 2019 г. переходным этапом исследований Института стало применение хорошо изученных МСК в новом аспекте – для лечения аутоиммунных заболеваний и в целом болезней, ассоциированных с избыточным иммунным ответом. Проведены клинические испытания, которые показали эффективность такого подхода в лечении системной красной волчанки и COVID-19-ассоциированных пневмоний.

В отделении клеточной терапии Института успешно применяется разработанный авторами статьи БМКП на основе иммуногенных ДК для клеточной иммунотерапии онкозаболеваний.

В 2021 г. ИБКИ совместно с БГМУ приступил к выполнению мероприятий ГП «Научные технологии и техника» на 2021–2025 гг. по разработке совершенно новых для нашей страны БМКП на основе цитокин-индуцированных киллерных клеток (ЦИКК) для лечения онкозаболеваний урогенитальной сферы, толерогенных ДК (толДК) – для терапии сахарного диабета 1 типа (СД1), регуляторных Т-лимфоцитов (Т-рег) – при системном склерозе (СС). С 2022 г. начинаются соответствующие клинические исследования.

Характеристика ЦИКК как БМКП

ЦИКК впервые были описаны Schmidt-Wolf G. и соавт. в 1991 г. [4] и представляют собой гетерогенную популяцию поликлональных лимфоцитов, полученных *ex vivo* из общей фракции мононуклеаров периферической или пуповинной крови путем стимуляции интерфероном (ИНФ)- γ , анти-CD3 (ОКТ3) антителами и интерлейкином (ИЛ)-2. ЦИКК характеризуются иммунофенотипическими свойствами как Т-лимфоцитов (CD3), так и естественных киллерных клеток (ЕК-клеток) (CD16, CD56, CD57) [5–7]. Установлено, что противоопухолевая эффективность ЦИКК в значительной степени связана с подгруппой CD3⁺CD56⁺ естественных киллерных Т-клеток [7].

ЦИКК опосредуют уничтожение опухолевых клеток через несколько эффекторных механизмов: посредством перфорин/гранзим-содержащих гранул, рецепторов апоптоза и антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности [8, 9]. ЦИКК секретируют ряд провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли (ФНО)- α , ИНФ- γ и ИЛ-2), которые дополнительно усиливают системную противоопухолевую активность и индуцируют иммунный Th1-ответ [10].

Показано, что пролиферативная и противоопухолевая активность ЦИКК увеличивается после совместного культивирования *in vitro* с ДК, что может быть использовано в производственной схеме БМКП [11].

В международной базе данных clinicaltrials.gov о проводимых клинических исследованиях зарегистрировано 27 клинических испытаний терапии онкологических заболеваний (лейкемия, колоректальный рак, рак молочной железы, легких, почки, простаты, печени) с помощью ЦИКК, которые на данный момент завершены. Введение ЦИКК проводилось как в сочетании с химиотерапией, так и котрансплантацией ДК.

По данным первых клинических исследований применения ЦИКК после хирургической резекции опухоли в некоторых случаях наблюдается стабилизация злокачественного процесса или регрессия метастазов. Показано, что использование ЦИКК, полученных из пуповинной крови, было безопасно у пациентов с рецидивом острой лейкемии после трансплантации костного мозга [12, 13]. Установлено, что у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой, которые прошли курс лечения, адъювантная иммунотерапия ЦИКК увеличивала выживаемость без прогрессирования и общую выживаемость [14, 15].

В 2004 г. китайскими учеными опубликованы результаты исследований влияния аутологичных ЦИКК на фенотип субпопуляций Т-лимфоцитов и ДК у пациентов (n=13) с первичной гепатоцеллюлярной карциномой. После иммунотерапии ЦИКК у пациентов установлено увеличение содержания CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD56⁺ и CD25⁺ клеток, ДК типа 1 и типа 2. У пациентов отмечено замедление роста опухолей, их объем уменьшился у 3 пациентов. Отмечена безопасность и переносимость данного способа лечения [16].

По результатам еще одного китайского клинического испытания ЦИКК у 15 пациентов с немелкоклеточным раком легкого на 3–4-й стадии установлен рост количества ЕК-клеток при одновременном снижении Т-регуляторных клеток через 2 недели после введения БМКП. Также увеличивалась концентрация противоопухолевых цитокинов (ИНФ-γ, ИНФ-γ-индуцируемого белка 10, ФНО-α, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), хемотаксического белка моноцитов-3 и ИЛ-21) и снижалась экспрессия иммуносупрессивного трансформирующего фактора роста (ТФР)-β1. Медианы выжи-

ваемости без прогрессирования и общей выживаемости в группе пациентов, получивших терапию ЦИКК, были достоверно выше по сравнению с контрольной группой. В период терапии серьезных побочных эффектов не наблюдалось [17].

В Республике Беларусь методы клеточной иммунотерапии метастатических опухолей урогенитальной сферы с применением ЦИКК ранее не разрабатывали. В течение 2021 г. в ИБКИ разработана технология накопления *in vitro* биомассы ЦИКК. Для ее дифференцировки и накопления определены оптимальные концентрации рекомбинантных цитокинов ИНФ-γ, ИЛ-2, антител к CD3 и условия культивирования, позволяющие получить морфологически (лимфоцитоподобная морфология, рост в виде клеточных конгломератов) и фенотипически (CD45⁺CD3⁺CD16⁺) полноценные ЦИКК для дальнейшего производства БМКП на их основе. Технология способствует увеличению содержания ЦИКК в 8–10 раз по сравнению с исходной культурой (более 40% к 10–12 суткам культивирования) (рис. 1).

Характеристика Т-рег как БМКП

Т-рег – основные клетки периферической крови, выполняющие регуляторную функцию и опосредующие периферическую иммунологическую толерантность [18]. Они способны подавлять аутоиммунные и аллергические реакции, предотвращать отторжение трансплантата, но вместе с тем существенно уменьшают резервы противоопухолевого и противоинфекционного иммунитета [19, 20]. Впервые Т-рег были описаны S. Sakaguchi с соавт. при исследовании аутоиммунных заболеваний у мышей как специализирующиеся на подавлении излишней активности иммунной системы CD4⁺CD25⁺ Т-клетки [21].

Т-рег классифицируют по происхождению следующим образом:

- клетки тимического происхождения – *thymic-derived T-regs* – *tT-regs* (ранее их называли «natural» – *nT-regs*);
- Т-рег, функциональная активность которых сформирована в периферических лимфоидных органах под действием ряда факторов – *peripheral-derived pT-regs*;
- *inducible iT-regs*, получаемые *in vitro*.

Естественные Т-рег дифференцируются из CD4-позитивных Т-клеток в тимусе в процессе негативной селекции, которая необходима для предупреждения выхода на перифе-

рию Т-клеток, специфичных к аутоантигенам [22]. Фенотипически Т-рег характеризуются наличием на мембране молекулы CD25 (α -цепь рецептора к ИЛ-2), экспрессируют транскрипционный фактор FoxP3. В 2006 г. было показано, что Т-рег не экспрессируют молекулу CD127 (рецептор к ИЛ-7), чем отличаются от активированных Т-клеток. Таким образом, фенотип Т-рег может быть представлен в виде $CD4^+CD25^{hi}CD127^-FoxP3^+$. Т-рег являются достаточно гетерогенной популяцией. В настоящее время идентифицированы многочисленные субпопуляции Т-рег, среди которых наибольшее значение придают тем, которые относятся к их дифференцированности: $CD197^+$ и $CD62L^+$ (маркеры хоуминга и миграции в лимфоидные органы), $CD45R0$ (маркер клеток, прошедших антиген-зависимую дифференцировку), $CD45RA$ (маркер клеток, не прошедших антиген-зависимую дифференцировку) Т-рег. По экспрессии молекулы CD31 (PECAM-1) наивные Т-рег разделяют на тимически наивные $CD31^+$ клетки и центральные наивные $CD31^-$ хелперы [23–25].

Иммуносупрессорные механизмы Т-рег реализуются как путем межклеточных взаимодействий, так и продукцией/секрецией ряда растворимых факторов. Среди основных хорошо описанных в литературе молекул, экспрессируемых на Т-рег и опосредующих иммуносупрессивную функцию, следует отметить: CTLA-4 (CD152), галектины, в частности галектин-9, молекула CD223 (Lag-3), нейропилин-1 (CD304) [26–30]. Т-рег продуцируют спектр канонических иммуносупрессивных цитокинов, таких как ТФР- β , ИЛ-10, ИЛ-35, которые подавляют функцию эффекторных Т-клеток и антигенпрезентирующих клеток, связываясь с соответствующими рецепторами на поверхности [32]. Показано, что Т-рег могут инициировать апоптоз клеток при помощи перфорин-гранзимового механизма, который является основ-

ным способом киллинга мишеней цитотоксическими Т-клетками и ЕК-клетками. Важное свойство Т-рег – опосредованное эктонуклеотидазами CD39/CD73 образование аденозина из АТФ, который подавляет активность эффекторных клеток, антигенпрезентирующих клеток, ЕК-клеток [32].

В норме в периферической крови Т-рег содержится 1–10% от всех циркулирующих $CD4^+$ клеток. Изменение количества Т-рег, а также их мутация в гене FoxP3, вследствие которой клетки становятся дисфункциональными, часто является причиной многих аутоиммунных заболеваний [33]. Так, при рассеянном склерозе, СД1, псориазе и миастении было обнаружено, что Т-рег периферической крови обладают пониженной способностью подавлять пролиферацию Т-клеток и продукцию ИНФ- γ [34–36]. Недавние данные, полученные от пациентов с аллергическими или астматическими заболеваниями,

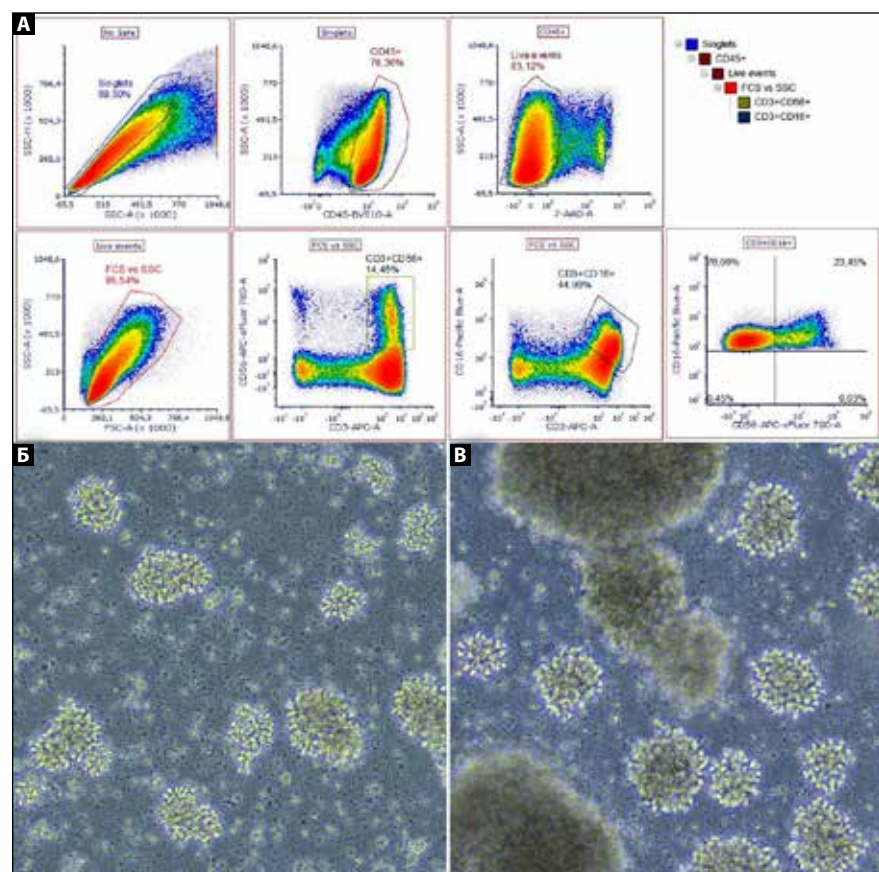


Рис. 1. Морфология и иммунофенотип культур ЦИКК:

А – анализ методом проточной цитофлуориметрии содержания в культурах ЦИКК с иммунофенотипом $CD45^+CD3^+CD16^+$; Б – морфология культур ЦИКК на 2-е сутки роста; В – морфология культур ЦИКК на 10-е сутки роста, фазово-контрастная микроскопия, ув. $\times 100$

свидетельствуют о снижении частоты секретирующих ИЛ-10 Т-рег по сравнению со здоровыми людьми [37, 38]. При иммунофенотипическом исследовании периферической крови пациентов с СС разные группы ученых обнаруживали пониженное содержание Т-рег, которое сопровождалось увеличением процента Th17 клеток и снижением уровня циркулирующего ИЛ-10 по сравнению со здоровыми людьми [39–42].

Учитывая тот факт, что в иммунопатогенезе многих системных заболеваний соединительной ткани немаловажную роль играет снижение содержания и функциональной активности Т-рег, применение их большого количества может оказывать терапевтический эффект.

В международной базе данных clinicaltrials.gov имеется 33 записи о применении Т-рег. Данные изыскания в основном направлены на предотвращение реакции «трансплантат против хозяина» при пересадке органов и тканей. Так, была

показана безопасность и эффективность лечения при трансплантации костного мозга, печени и почки [43–45], не зафиксированы отрицательные реакции на инфузию во время первой фазы клинического испытания Т-рег в качестве терапии СД1 и болезни Крона [46, 47]. В 2019 г. было проведено однократное введение Т-рег пациенту, страдающему системной красной волчанкой, что не привело к снижению индекса активности заболевания, но позволило добиться кратковременного противовоспалительного и иммуносупрессивного эффекта [48]. С 2017 г. по настоящее время проводятся исследования по лечению Т-рег потенциально опасного аутоиммунного заболевания пузырчатки обыкновенной (NCT03239470), перспективность метода продемонстрирована на мышинной модели [50].

В Институте разрабатываются БМКП на основе Т-рег для лечения СС – аутоиммунного заболевания соединительной ткани [50]. В его иммунопатогенезе выделяют 3 ключевых процесса, которые определяют клинические и патоморфологические проявления: формирование антигенспецифических клеток (АСК) и продукция аутоантител, фиброзопролиферативная васкулопатия сосудов и дисфункция фибробластов, что приводит к избыточному накоплению коллагена и других матричных компонентов в коже, кровеносных сосудах и внутренних органах [51].

Принципы лечения СС заключаются в противофиброзной терапии, лечении сосудистых осложнений, применении лекарственных средств, подавляющих воспаление (глюкокортикоидов (ГКС), нестероидных противовоспалительных и цитостатиков). Эффект ГКС наступает практически сразу после назначения, в этой связи ГКС остаются препаратами выбора при течении заболевания с висцеральными проявлениями. В то же время длительная терапия ГКС ассоциирована со спектром осложнений, в том числе жизнеугрожающих. В лечении СС применяют цитостатики (циклофосфамид, циклоспорин А, микофенолата мофетил). Все они имеют ограниченное значение ввиду токсичности или отсутствия эффекта [52–54]. Требуются новые лечебные средства, которые позволили бы улучшить результаты терапии пациентов с СС.

В 2021 г. сотрудники Института разработали методику получения и накопления биомассы Т-рег из периферической крови. На основании сравнительного анализа различных условий культивирования клеток и с учетом стоимо-

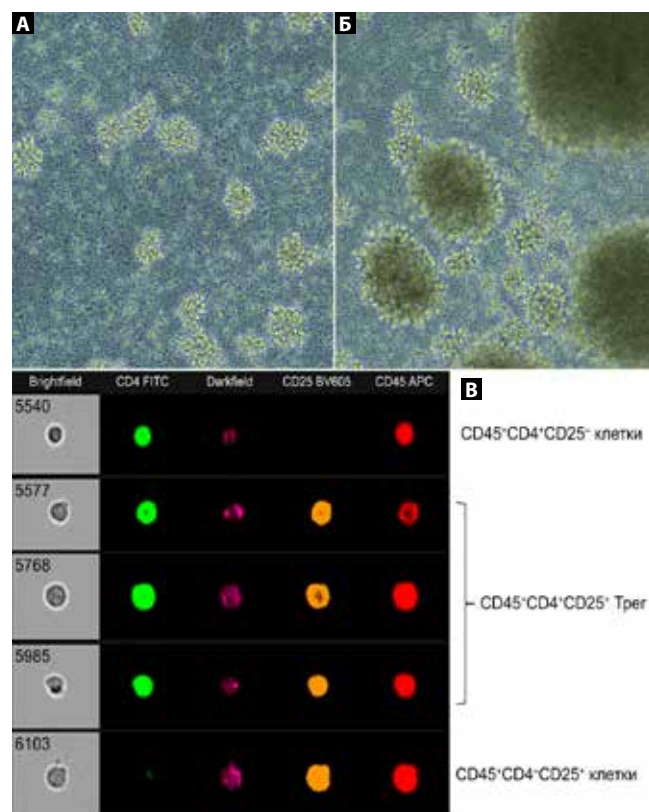


Рис. 2. Морфология и иммунофенотип культур Т-рег: А – морфология культур Т-рег на 2-е сутки роста; Б – морфология культур Т-рег на 7-е сутки роста (фазово-контрастная микроскопия, ув. $\times 100$); В – анализ изображений и выявление $CD45^+CD4^+CD25^+$ Т-рег методом визуализирующей проточной цитометрии

сти реагентов разработан алгоритм получения и накопления терапевтически значимого количества биомассы Т-рег в условиях *in vitro*, основанный на использовании в качестве исходной первичной культуры чистой популяции CD4⁺ Т-лимфоцитов, выделенной методом иммуномагнитной сепарации из фракции мононуклеаров периферической крови. Определены оптимальные сроки культивирования (7–10 суток) и состав питательной среды (RPMI-1640, ИЛ-2, антитела к молекулам CD3 и CD28). Исследованы морфология и иммунофенотип полученных клеток, они характеризовались высокой жизнеспособностью, подлинность Т-рег подтверждена по соответствию фенотипу CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} (рис. 2).

Разработаны научно обоснованные критерии контроля качества БМКП на основе Т-рег, которые включают оценку стерильности, подлинности (фенотип CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}), жизнеспособности (>85%) и количества Т-рег в единичной дозе БМКП не менее 0,5 млн клеток/кг массы тела пациента.

Характеристика толДК как БМКП

ДК – основные антигенпредставляющие клетки организма, обладают способностью как к активации, так и к торможению специфического иммунного ответа. ТолДК – это ДК с иммуносупрессивными свойствами, которые способны вводить иммунную систему в толерогенное состояние, направленное против различных антигенов [55].

ТолДК поддерживают центральную и периферическую толерантность к аутоантигенам путем элиминации АСК, ингибируют ответ Т-клеток памяти, запускают анаergie Т-клеток и стимулируют дифференцировку Т-рег. Исследования, проведенные в последние годы, указывают на возможность применения в лечении и профилактике аутоиммунных заболеваний толДК. В отличие от системных иммуносупрессантов, они не затрагивают иммунитет в целом, а способны целенаправленно элиминировать звенья, участвующие в аутоиммунном воспалении и повреждении тканей. Лекарственные средства, обеспечивающие избирательную элиминацию АСК, пока неизвестны. ИБКИ совместно с БГМУ приступил к разработке метода клеточной терапии СД1 с использованием толДК.

СД1 – одно из социально значимых аутоиммунных заболеваний человека. Распространено на 0,2–0,4% общей популяции и возни-

кает в результате органоспецифического иммунного разрушения инсулин-продуцирующих β-клеток в островках Лангерганса в поджелудочной железе с последующим развитием абсолютного дефицита инсулина. Это заболевание возникает на фоне генетической предрасположенности под действием факторов внешней среды. К факторам генетической предрасположенности относят, например, наличие аллелей DRB1 0401, DRB1 0402, DRB1 0405, DQA1 0301, DQB1 0302 или DQB1 0201 в локусе HLA [56]. Триггерами СД1 могут являться инфекционные и неинфекционные факторы (включая энтеровирусы, ретровирусы, SARS-CoV-2) [57].

Скрытая фаза СД1 может длиться от нескольких месяцев до многих лет, после чего у пациентов можно обнаружить аутоантитела к аутоантигенам: инсулину (IAA), глутаматдекарбоксилазе (GAD65), цитоплазматическим компонентам островковых клеток (ICA), тирозинфосфатаза-подобному белку (IA-2A), транспортеру цинка (Zn-T8A) [58]. После того, как значительное количество β-клеток разрушается (более 80%), начинают проявляться клинические симптомы СД1, и необходима пожизненная заместительная терапия – многократное введение экзогенного инсулина в течение суток с имитацией физиологического ритма инсулиновой секреции. Сохранность остаточной секреции инсулина позволит оптимизировать колебания гликемии и временно улучшить качество жизни пациентов.

Терапевтическая эффективность толДК в лечении аутоиммунных заболеваний может обеспечиваться за счет иммуносупрессивных свойств клеток: способности секретировать иммуносупрессивные молекулы (CD205, CD274) и цитокины, например ИЛ-10 и ТФР-β, которые способны оказывать двойной эффект на Т-клетки. За счет этого оказывается двойной эффект на Т-клетки: с одной стороны, запускается дифференцировка наивных Т-клеток в сторону Т-рег, с другой – ДК активируют анаergie и делецию Т-клеток [59].

Инсулин, GAD65 и другие аутоантигены, являющиеся мишенями аутоагрессии при развитии СД1, могут быть использованы для праймирования толДК, способных специфически ингибировать действие аутореактивных Т-клеток, тем самым обеспечивая восстановление толерантности к аутоантигенам, при этом избегая общей иммуносупрессии в организме.

Из открытых источников известно, что до настоящего времени завершены 6 клинических испытаний с применением толДК, в которых

участвовали пациенты с аутоиммунными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит, СД1, рассеянный склероз и болезнь Крона [60, 61]. На данный момент проводятся два – для лечения пациентов с рассеянным склерозом (NCT02903537 и NCT04530318). В 2021 г. стартовала 1-я фаза клинического исследования по оценке эффективности применения аутологических толДК, праймированных проинсулиновым пептидом (C19-A3), для лечения пациентов с СД1 (NCT04590872; P1repTolDCs) на базе медицинского центра «Город надежды» (США).

Достигнуты определенные успехи в получении *ex vivo* толДК, которые бы формировали периферическую толерантность, подавляя иммунный ответ против определенных аутоантигенов, что сделало бы их важным персонализированным терапевтическим средством в лечении заболеваний с аутоиммунным компонентом в этиопатогенезе. Существует несколько протоколов для дифференцировки толДК. Они генерируются из моноцитов периферической крови человека путем воздействия на клетки ГМ-КСФ, ИЛ-4 [62, 63] и витамина Д3, которые индуцируют дифференцировку моноцитов в незрелые ДК с последующим сокультивированием с культурой МСК, позволяющей получить толерогенные свойства ДК.

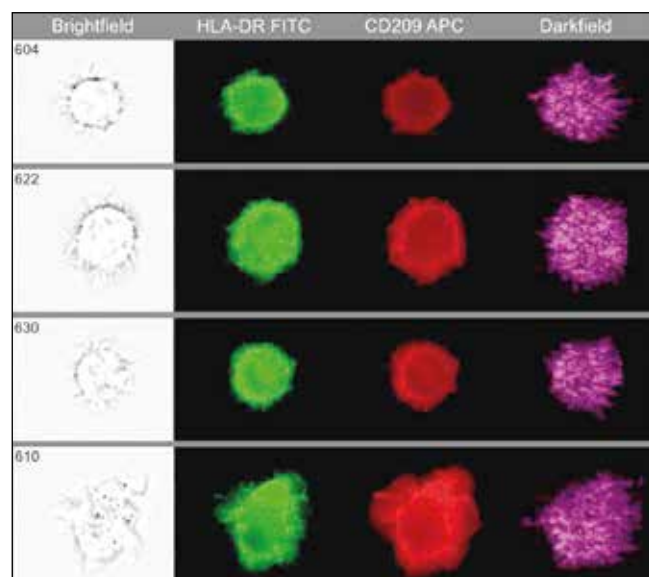


Рис. 3. Анализ морфологии и иммунофенотипа культур толДК методом визуализирующей проточной цитометрии

Процесс разработки методов получения толДК начат авторами статьи с 2013 г. в период работы в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. На первых этапах оценена эффективность генерации толДК с использованием иммуносупрессивных веществ [64], затем был разработан и запатентован метод получения толДК путем сокультивирования с МСК [65, 66].

В ИБКИ тема продолжила развитие в рамках ГПНИ (2019–2020 гг.), результаты были уточнены и усовершенствованы, а разработанная методика позволит получить БМКП со стабильными толерогенными свойствами, не подвергающимися реверсии в присутствии даже мощных индукторов провоспалительных свойств.

Для лечения СД1 метод модифицирован для усиления специфических иммуносупрессивных свойств, изучается функциональная активность толДК, праймированных аутоантигенами, задействованными в иммунопатогенезе СД1. Отобран наиболее эффективный способ генерации толерогенных свойств у ДК – сокультивирование ДК с культурой МСК обонятельной выстилки в присутствии витамина Д3: CD209⁺ клетки характеризуются снижением экспрессии HLA-DR, CD86, CD83, при этом не выявлено снижение экспрессии коингибиторных молекул (CD273, CD275, CD85k) (рис. 3).

В 2022–2023 гг. будут проведены клинические испытания для оценки безопасности, переносимости, иммунологической и клинической эффективности разработанных клеточных продуктов. В исследованиях принимают активное участие молодые сотрудники и аспиранты Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси и Белорусского государственного медицинского университета, все результаты станут основой кандидатских и докторских диссертаций.

Изучение БМКП на основе клеток системы иммунитета положило начало новому этапу развития клеточных технологий. Выполнение запланированных исследований позволит повысить эффективность лечения социально значимых заболеваний, а разрабатываемые методы оказания медицинской помощи предполагают применение их амбулаторно и в условиях дневного стационара.

Следовательно, эти методы с легкостью будут внедрены в работу Отделения клеточной терапии Института и в организации здравоохранения. ■

Наталья Антоневиц,
завлабораторией
иммунологии и клеточной
биофизики Института биофизики
и клеточной инженерии
НАН Беларуси, кандидат
биологических наук;
antonevich.n@gmail.com

Андрей Гончаров,
директор Института биофизики
и клеточной инженерии
НАН Беларуси,
кандидат медицинских
наук, доцент;
andrei.hancharou@gmail.com

Оксана Тимохина,
научный сотрудник лаборатории
иммунологии и клеточной
биофизики Института биофизики
и клеточной инженерии
НАН Беларуси;
oksanabuschik@gmail.com

Елена Рында,
научный сотрудник лаборатории
иммунологии и клеточной
биофизики Института биофизики
и клеточной инженерии
НАН Беларуси;
alenarynda@gmail.com

Яна Минич,
младший научный сотрудник
лаборатории иммунологии
и клеточной биофизики
Института биофизики
и клеточной инженерии
НАН Беларуси;
yana-minich@tut.by

Александр Прохоров,
заведующий кафедрой онкологии
Белорусского государственного
медицинского университета,
доктор медицинских наук,
профессор;
aprokharau@gmail.com

Татьяна Мохорт,
заведующий кафедрой
эндокринологии Белорусского
государственного медицинского
университета, доктор
медицинских наук, профессор;
tatsianamokhort@gmail.com

Константин Чиж,
доцент 2-й кафедры внутренних
болезней Белорусского
государственного
медицинского университета,
кандидат медицинских
наук, доцент;
dr.chyzh@rambler.ru

- **Summary:** Cellular therapy develops rapidly throughout the world. The list of diseases of various etiologies that are treated with biomedical cellular products is constantly growing. The Center for Immunology and Allergy was opened in the The Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Science of Belarus in 2021. Since that the developing of new biomedical cell products for the correction of immunopathological conditions was started in collaboration with the Belarusian State Medical University. The technologies for producing of biomedical cellular products based on cytokine-induced killer cells for the treatment of oncological diseases of the urogenital area, tolerogenic dendritic cells for the treatment of type 1 diabetes, and regulatory T lymphocytes for the treatment of sclerosis were developed.
- **Keywords:** cell therapy, biomedical cell product, immunotherapy, cytokine-induced killer cells, t-regulatory cells, tolerogenic dendritic cells.
- <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2022-2-15-23>

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. О здравоохранении: Закон Респ. Беларусь, 18 июня. 1993 г., №2435-XII // [Pravo.by](https://pravo.by/document/?guid=3871&p0=v19302435) // <https://pravo.by/document/?guid=3871&p0=v19302435>.
2. Современные методы диагностики, лечения и профилактики заболеваний – 2022 // <http://med.by/methods/>.
3. Реестры УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» // РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» // 2022 // https://www.rceth.by/Refbank/reestr_biomeditsinskih_kletochnih_produktov/results.

4. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity / I.G. Schmidt-Wolf [et al.] // *J. Exp. Med.* 1991. Vol. 174. №1. P. 139–149.
5. CD58/LFA-3 and IL-12 provided by activated monocytes are critical in the in vitro expansion of CD56+ T cells / R.D. Lopez [et al.] // *Cancer Immunol. Immunother.* 2001. Vol. 49, №12. P. 629–640.
6. Y.C. Linn. Generation of cytokine-induced killer cells from leukaemic samples with in vitro cytotoxicity against autologous and allogeneic leukaemic blasts / Y.C. Linn, L.C. Lau, K.M. Hui / *Br.J. Haematol.* 2002. Vol. 116, №1. P. 78–86.
7. Alloreactivity and anti-tumor activity segregate within two distinct subsets of cytokine-induced killer (CIK) cells: implications for their infusion across major HLA barriers / D. Sangiolo [et al.] // *Int. Immunol.* 2008. Vol. 20, №7. P. 841–848.
8. T.L. Schmidt. A killer choice for cancer immunotherapy / T.L. Schmidt, R.S. Negrin, C.H. Contag / *Immunol. Res.* 2014. Vol. 58, №2–3. P. 300–306.
9. Enhanced killing of human B-cell lymphoma targets by combined use of cytokine-induced killer cell (CIK) cultures and anti-CD20 antibodies / A. Pievani [et al.] // *Blood.* 2011. Vol. 117, №2. P. 510–518.
10. Cytokine-induced killer cells as pharmacological tools for cancer immunotherapy / X. Gao [et al.] // <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00774/full>.
11. Influence of autologous dendritic cells on cytokine-induced killer cell proliferation, cell phenotype and antitumor activity in vitro / J. Cao [et al.] // *Oncol Lett.* 2016. Vol. 12, №3. P. 2033–2037.
12. Cytokine-induced killer (CIK) cells in leukemia patients (CIK2) // <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01186809>.
13. Feasibility and safety of adoptive immunotherapy with CIK cells after cord blood transplantation / M. Introna [et al.] // *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2010. Vol. 16, №11. P. 1603–1607.
14. Efficacy and safety of Immuncell-LC group and non-treatment group in hepatocellular carcinoma patients // clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00699816.
15. Adjuvant immunotherapy with autologous cytokine-induced killer cells for hepatocellular carcinoma / J.H. Lee [et al.] // *Gastroenterology.* 2015. Vol. 148, №7. P. 1383–1391.
16. Autologous cytokine-induced killer cell therapy in clinical trial phase I is safe in patients with primary hepatocellular carcinoma / M. Shi [et al.] // *World J. Gastroenterol.* 2004. Vol. 10, №8. P. 1146–1151.
17. Cytokine-induced killer cell therapy for modulating regulatory T cells in patients with non-small cell lung cancer / B. Yu [et al.] // *Exp. Ther. Med.* 2017. Vol. 14, №1. P. 831–840.
18. W. Zou. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy // *Nat Rev Immunol.* 2006. №6(4). P. 295–307. doi: 10.1038/nri1806. PMID: 16557261.
19. P. Lapierre, Lamarre A. Regulatory T Cells in Autoimmune and Viral Chronic Hepatitis // *J Immunol Res.* – 2015;2015:479703. doi: 10.1155/2015/479703. Epub 2015 May 28. PMID: 26106627; PMCID: PMC4464004.
20. Y. Yao, CL. Chen, D. Yu, Z. Liu. Roles of follicular helper and regulatory T cells in allergic diseases and allergen immunotherapy // *Allergy.* 2021. 76(2). P. 456–470. doi: 10.1111/all.14639. Epub 2020 Nov 4. PMID: 33098663.
21. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M. [et al.] Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases // *J Immunol.* 1995. 155(3). P. 1151–1164. PMID: 7636184.
22. J. Tellier, J.P. van Meerwijk, P. Romagnoli. An MHC-linked locus modulates thymic differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes // *Int Immunol.* 2006. 18(11). P. 1509–1519. doi:10.1093/intimm/dx1084.
23. P. Romagnoli, J. Tellier, J.P. van Meerwijk. Genetic control of thymic development of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes // *Eur J Immunol.* 2005. 35(12). P. 3525–3532. doi:10.1002/eji.200535225.

Полный список использованных источников размещен

 [SEE http://innosfera.by/2022/02/cell_therapy](http://innosfera.by/2022/02/cell_therapy)

Статья поступила в редакцию 06.07.2021 г.