

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИ-GD2 CAR-T-КЛЕТОК С РАЗЛИЧНЫМ АНТИГЕН- РАСПОЗНАЮЩИМ МОДУЛЕМ

Луцкович Д.В., Керезь М.А., Клыч А.В., Луцкович Е.С.,
Мелешко А.Н.

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»,
д. Боровляны, Минская обл., Республика Беларусь

Резюме. Нейробластома (НБ) — самая распространенная экстракраниальная солидная опухоль у детей, 8-10% всех детских опухолей и частотой около 1-1,3 случая на 100 тыс. детей до 15 лет. Несмотря на использование интенсивного лечения с хирургическим вмешательством, высокодозной химиотерапией и радиотерапией, 5-летняя бессобытийная выживаемость составляет 25-50%, после рецидива — 10-40%. За последнее десятилетие стремительно развивается новый вид клеточной терапии с модификацией лимфоцитов химерным антигенным рецептором (CAR). Одним из основных известных антигенов для создания CAR-T-терапии против НБ является дисиаialogанглиозид GD2, экспрессия которого характерна в 100% случаев этого заболевания. Большинство клинических вариантов анти-GD2 CAR основаны на scFv 14.G2, происходящим из химерного антитела 14.18 (денутуксимаб). В 2020 FDA утвердило новое анти-GD2 гуманизированное антитело, 3F8 (накситамаб) с лучшим профилем безопасности. Несмотря на частичный успех, результаты анти-GD2 CAR-T-терапии остаются скромными. Одним из вариантов увеличения специфичности рецептора является таргетирование О-ацетил-GD2, производное дисиаialogанглиозида, в котором внешний остаток сиаловой кислоты модифицирован О-ацетиловым эфиром. Ацетилирование GD2 происходит только в опухолевых клетках и не встречается в периферических нервах. Известно антитело 8B6, таргетирующее О-ацетил-GD2. Таким образом, как минимум 3 терапевтических антитела, 14G2a, hu3F8 и 8B6, конкурируют друг с другом за таргетирование GD2 с помощью CAR-T-клеток. И во всех случаях анти-GD2 CAR содержит вставочные домены во внеклеточной части молекулы. Результаты отдельных клинических испытаний опубликованы для CAR-T на основе 14G2a и hu3F8, но пока нет данных по использованию антитела 8B6 в составе CAR. Цель настоящего исследования — получить химерные антигенные рецепторы 2-го поколения на основе трех антител, с различной длиной внеклеточного домена и оценить их функциональную активность в отношении ряда клеточных линий для обоснования дальнейших клинических испытаний.

Ключевые слова: нейробластома, иммунотерапия, антиген, GD2, О-ацетил-GD2, CAR-T

Адрес для переписки:

Луцкович Дмитрий Викторович
ГУ «Республиканский научно-практический центр
детской онкологии, гематологии и иммунологии»
223053, Республика Беларусь, Минская обл.,
д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43.
Тел.: +375172871068.
E-mail: LutskovichDM@gmail.com

Address for correspondence:

Dmitry V. Lutskovich
Belarusian Research Center for Pediatric Oncology,
Hematology and Immunology
43 Frunzenskaya St
Borovlyany village, Minsk Region
223053 Republic of Belarus
Phone: +375172871068.
E-mail: LutskovichDM@gmail.com

Образец цитирования:

Д.В. Луцкович, М.А. Керезь, А.В. Клыч, Е.С. Луцкович,
А.Н. Мелешко «Функциональная активность
анти-GD2 CAR-T-клеток с различным антиген-
распознающим модулем» // Медицинская иммунология,
2025. Т. 27, № 5. С. 1001-1012.
doi: 10.15789/1563-0625-FAO-3161

© Луцкович Д.В. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

D.V. Lutskovich, M.A. Keraz, H.V. Klych, E.S. Lutskovich,
A.N. Meleshko "Functional activity of anti-GD2 CAR-T
cells with different antigen-recognition module", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025,
Vol. 27, no. 5, pp. 1001-1012.
doi: 10.15789/1563-0625-FAO-3161

© Lutskovich D.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-FAO-3161

FUNCTIONAL ACTIVITY OF ANTI-GD2 CAR-T CELLS WITH DIFFERENT ANTIGEN-RECOGNITION MODULE

Lutskovich D.V., Keraz M.A., Klych H.V., Lutskovich E.S.,
Meleshko A.N.

Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany village, Minsk Region, Republic of Belarus

Abstract. Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial solid tumor in children comprising, 8 to 10% of all pediatric tumors, with incidence of about 1-1.3 cases per 100,000 children under 15 years of age. Despite the use of intensive treatment with surgery, high-dose chemotherapy and radiotherapy, the 5-year event-free survival rate is 25-50% and 10-40% after relapse. Over the past decade, a new type of cell therapy with chimeric antigen receptor (CAR) modification of lymphocytes has been rapidly developed. Among the main promising antigens for development of CAR-T therapy against NB is the disialoganglioside GD2, the expression of which is shown in 100% of NB cases. Most clinical variants of anti-GD2 CAR-T cells are based on scFv 14.G2, originating from chimeric antibody 14.18 (denutuximab). In 2020, the FDA approved a new anti-GD2 humanized antibody, 3F8 (naxitamab) with a better safety profile. Despite partial success, the results of anti-GD2 CAR-T therapy remain modest. One option to increase receptor specificity is based on targeting O-acetyl-GD2, a disialoganglioside derivative in which the external sialic acid residue is modified with an O-acetyl ester. Acetylation of GD2 occurs only in tumor cells, and it is not detected in peripheral nerves. An 8B6 antibody is known to target O-acetyl-GD2. Thus, at least 3 therapeutic antibodies, 14G2a, hu3F8 and 8B6, compete with each other for targeting GD2 with CAR-T cells. In all these cases, the anti-GD2 CAR contains insertion domains in extracellular portion of the molecule. Results of separate clinical trials have been published for CAR-T based on 14G2a and hu3F8. So far, however, there are no data on the usage of 8B6 antibody in CARs. The aim of the present study is to obtain 2nd generation chimeric antigenic receptors based on three antibodies with different lengths of extracellular domain, and to evaluate their functional activity against a number of cell lines to justify further clinical trials.

Keywords: neuroblastoma, immunotherapy, antigen, GD2, O-acetyl-GD2, CAR-T

Введение

Нейробластома (НБ) — самая распространенная экстракраниальная солидная опухоль у детей, 8-10% всех детских опухолей и частотой около 1-1,3 случая на 100 тыс. детей до 15 лет [21]. Несмотря на использование интенсивного лечения с хирургическим вмешательством, высокодозной химиотерапией и радиотерапией, 5-летней бессобытийная выживаемость составляет 25-50%, после рецидива 10-40 [1]. За последние десятилетия развитие иммунотерапии достигло значительного прогресса в лечении онкологических заболеваний. Одним из перспективных направлений иммунотерапии является терапия Т-лимфоцитами, экспрессирующими трансгенный рецептор Т-клеток (TCR) или химерные антигенные рецепторы (CAR).

Химерный антигенный рецептор для распознавания антигена как правило использует одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), полученный из варибельных доменов тяжелой и легкой цепей антитела, распознающий определенный поверхностный антиген HLA-независимым образом. CAR кодируется одним геном, состоящим из scFv, шарнира или спейсера, трансмембран-

ной области, сигнального домена, такого как цепь CD3 ζ из комплекса TCR, и домена костимуляции (в основном 4-1BB и/или CD28) [11]. Клинический опыт применения CAR-T-клеточной терапии в целом оказался успешным, в основном при гематологических злокачественных новообразованиях, с разработкой анти-CD19 CAR-препаратов, таких как Kymriah, Yescarta, Brexanzi и Tecartus, все из которых одобрены Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) для лечения В-клеточных злокачественных новообразований.

Клинические результаты, полученные при использовании CAR для воздействия на солидные опухоли у взрослых или детей, на сегодняшний день показывают более слабую эффективность, чем при гематологических опухолях, отчасти из-за отсутствия целевых специфических антигенов, демонстрирующих низкую устойчивость и эффективность [16].

Одним из основных целевых антигенов для создания CAR-T-терапии против НБ является ганглиозид GD2, который широко экспрессируется на поверхности этих клеток. Экспрессия GD2 сильно ограничена в незлокачественных тканях, при этом ее низкий уровень наблюдается

только на периферических нервах, меланоцитах кожи, мозге и остеопрогениторах [14]. На конец 2022 года, GD2 являлся второй по частоте встречаемости мишеней, используемых для солидных опухолей, после мезотелина, в том числе основная мишень для таргетирования неробластомы CAR-T [19]. Большинство клинических вариантов анти-GD2 CAR основаны на scFv 14.G2, происходящем из химерного антитела 14.18 (денутуксимаб) [15], реже используется гуманизированное антитело KM8138 [17]. В 2020 FDA утвердило новое анти-GD2 гуманизированное антитело, 3F8 (накситамаб) с лучшим профилем безопасности [6]. Во всех случаях анти-GD2 CAR содержит вставочные домены во внеклеточной части молекулы.

Одно из последних опубликованных клинических испытаний с результатами 1/2 фазы (GD2-CART01) опубликовано F. Del Bufalo в апреле 2023 г. Рецептор третьего поколения с CD28, 4-1BB и CD3z сигнальными доменами основан на 14.G2-антителе. В конструкцию добавлен индукцибельный суицидальный ген каспазы 9 для безопасности, что было применено для 1 пациента. 9 пациентов из 27 (33%) достигли полного ответа, и 5 из них сохранили ремиссию. CRS развился у 74% пациентов, в том числе grade 3 у одного. 7/27 пациентов развили тяжелую гепатотоксичность и 1/27 – нейротоксичность. Интересно, что болевой симптом, характерный для анти-GD2 антител, не был так выражен в случае анти-GD2 CAR-T [4]. Несмотря на частичный успех, результаты анти-GD2 CAR-T-терапии остаются скромными. Обзор клинических испытаний и варианты дальнейшего совершенствования метода CAR-T-терапии НБ изложены в последнем обзоре [12].

Одним из вариантов увеличения специфичности рецептора является таргетирование О-ацетил-GD2, производное дисиалоганглиозида в котором внешний остаток сиаловой кислоты модифицирован О-ацетиловым эфиром. Ацетилирование GD2 происходит только в опухолевых клетках и не встречается в периферических нервах [3, 5]. Известно mAb 8B6, специфичное именно к О-ацетил-GD2, для которого показана диагностическая ценность в распознавании материала НБ и меланомы методом иммуногистохимии [2]. Плотность экспрессии О-ацетил-GD2 на опухолевых клетках ниже, чем для GD2: от 10% до 50% молекул GD2 ацетилировано [7]. Доклинические испытания показали что 8B6-антитело обладает терапевтическим эффектом, схожим с 14.18, но лучшим профилем безопасности [18]. Таким образом, О-ацетил-GD2 является перспективной мишенью для CAR-T-терапии.

Таким образом, известно как минимум 3 терапевтических антитела, 14G2a, hu3F8 и 8B6 которые конкурируют друг с другом за таргетирование GD2 с помощью CAR-T-клеток. Результаты от-

дельных клинических испытаний опубликованы для CAR-T на основе 14G2a и hu3F8, но пока нет данных по использованию антитела 8B6 в составе CAR. Цель настоящего исследования получить химерные антигенные рецепторы 2-го поколения с различной длиной спейсера и оценить их функциональную активность в отношении ряда клеточных линий для обоснования дальнейших клинических испытаний.

Материалы и методы

Экспрессия маркеров нейробластомы на материале биопсии опухоли

Экспрессия маркеров в материале биопсии пациентов оценивалась методами проточной цитометрии. Исследованы биоптаты (ткань опухоли или пораженный костный мозг) опухоли от 23 пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом. При иммунофенотипировании методом проточной цитометрии регион опухолевых клеток оценивается по фенотипу CD45⁺, CD56⁺, CD9⁺, CD81⁺. Дополнительное окрашивание проводили антителами к GD2.

Клеточные линии

В работе были использованы следующие иммортализованные клеточные линии: Т-лимфоциты Jurkat (DSMZ Catalog ACC 282), HEK293T (ATCC CRL-3216) – полученной из клеток эмбриональных почек человека. IMR-32 (ATCC CCL-127), LAN-1 (DSMZ ACC 655) и SK-N-BE(2) (ATCC CRL-2271) – клеточные линии НБ человека. 143B (ATCC CRL-8303) и KHOS-240S (ATCC CRL-1545) – клеточные линии остеосаркомы человека. Идентичность всех клеточных линий была проверена путем генотипирования STR полиморфизмов. Отсутствие контаминации микоплазмы контролировали методом ПЦР.

Сборка конструкции CAR

Сборка конструкций осуществлялась методом рестрикции и лигирования на основе вектора pWPXL (Addgene plasmid # 12257). Синтетические последовательности ДНК scFv и компонентов CAR были заказаны в Synbio Technologies. Собранные последовательности рецепторов были клонированы по сайтам рестрикции BamHI и EcoRI (NEB) в вектор pWPXL и трансформированы в компетентные клетки XL10 Gold. Полученные бактериальные колонии проверялись методом ПЦР с конструктор-специфичными праймерами. Плазмидную ДНК выделяли коммерческим набором (NucleoBond® Xtra Maxi MN) из ночной культуры положительных по ПЦР бактериальных клеток колоний с OD > 3. Проверку правильности собранной конструкции проверяли рестрикционным картированием плазмидной ДНК и секвенированием по Сенгеру.

Получение CAR-T-клеток

В качестве исходного материала использовали периферическую кровь здорового донора с

антикоагулянтом ЭДТА. Фракцию мононуклеарных клеток (МНК) выделяли путем центрифугирования на градиенте плотности с подсчетом в растворе 3% уксусной кислоты в камере Горяева и концентрировали до 1×10^7 /мл. Т-клетки выделяли путем негативной иммуномагнитной селекции CD3⁺ клеток по инструкции набора EasySep (Thermo Fisher Scientific, США), считали в камере Горяева количество и жизнеспособность клеток в 0,4%-ном растворе трипанового синего и записывали соотношения CD4/CD8 и фенотипический состав. Активацию клеток перед трансдукцией обеспечивали магнитными частицами CD3/CD28 (Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28, Thermo Fisher Scientific, США) в течение 48 часов в среде RPMI-1640 (Gibco, США) с добавлением 10% ЭТС (Gibco, США) и $1 \times$ антибиотика-антимикотика в присутствии цитокинов IL-7, IL-15, IL-21 (Miltenyi Biotec, Германия) в концентрации 10 нг/мкл.

Спустя 48 часов после активации производили лентивирусную трансдукцию Т-клеток с множественностью инфекции 10 на плашках, обработанных RetroNectin (Takara Clontech, США) со спинокуляцией. Через сутки клетки отмывали той же полной средой с цитокинами и продолжали инкубацию в течение *in vitro* 8-12 суток с контролем прироста клеток, фенотипа и экспрессии tEGFR на 10-12-е сутки. Аналогичным образом, без добавления вируса, получали нетрансдуцированные лимфоциты, используемые в экспериментах в качестве МОСК-контроля.

NFAT индуцибельный GFP-репортер

Для проверки антиген-специфической активации химерных антигенных рецепторов нами был получен GFP-репортер путем трансдукции клеток Jurkat конструкцией с геном GFP под NFAT-индуцибельным промотором. Клон клеток Jurkat-NFAT-GFP, не обладающий фоновой флуоресценцией в отсутствие сигнала, далее был использован как репортерная клеточная линия. Клетки репортерной линии трансдуцировали тестируемыми конструкциями CAR так же, как и первичные Т-лимфоциты. В эксперименте на активацию, CAR⁺ Jurkat-NFAT-GFP-репортеры инкубировали в течение 18 часов совместно с модельными клеточными линиями мишеней, предварительно окрашенными красителем CellTrace Violet (Thermo Fisher Scientific, США). Активация оценивалась по проценту GFP⁺ клеток (нормализованное по количеству CAR⁺ клеток) и интенсивности сигнала флуоресценции (MFI) GFP.

Определение экспрессии маркера CD107a

В качестве мишеней использовали две клеточные линии — 143BGD2⁺ и LAN1GD2⁺. В качестве эффекторов CAR-Т-клетки донора 14G2a-BBz (S), 14G2a-BBz (L), 8B6-BBz (S), 8B6-BBz (L), hu3F8-BBz (L), в качестве контроля использовались лимфоциты без трансдукции CAR (МОСК). Для

разделения эффекторов и мишеней последние перед тестом стабильно окрашивались витальным красителем CellTrace Violet (Thermo Fisher Scientific, США). В 96 луночный планшет вносили клетки мишени и эффекторы в соотношении 1:1 без цитокинов, спустя час инкубирования в каждую лунку добавляли монензин (Sigma-Aldrich) и культивировали при 5% CO₂, 95 % влажности и 37 °C 20 часов. За 4 часа до окончания теста в каждую лунку добавляли моноклональное антитело (мАт) CD107a-PE. По завершению теста, образцы дополнительно окрашивались мАт — CD45-KO, CD3-PC7, CD8-FITC и приступали к записи на проточном цитофлуориметре DxFlex (Beckman Coulter, США).

Цитотоксический тест

Тест проводился в 96-луночном планшете при совместной инкубации эффекторов (CAR-Т-клеток и МОСК-контроль) с клетками-мишенями в течение 16 часов с последующей записью на проточном цитофлуориметре мертвых клеток мишеней с окраской 7-AAD. Тест проводился в триплетах для трех соотношений эффектор : мишень = 2:1, 1:1, 1:2. Для разделения эффекторов и мишеней последние перед тестом также окрашивались витальным красителем CellTrace Violet. Расчет цитотоксической активности (ЦТА) выполнялся по формуле (7AAD⁺ с эффекторами) — (7AAD⁺ без эффекторов) / 100% — (7AAD⁺ без эффекторов). В качестве мишеней использовали GD2⁺ клеточную линию НБ LAN1, в качестве отрицательного контроля — GD2⁻ линию остеосаркомы 143В.

Тест на истощение CAR-Т-клеток с рестимуляцией мишенями

Тест проводился в 96-луночном планшете при совместной инкубации эффекторов с клетками-мишенями с установленным соотношением 1:1 на день 0. Клетки-мишени перед тестом были окрашены витальным красителем CellTrace Violet. Каждые 2 дня производили запись одной исследуемой лунки на проточном цитофлуориметре, для определения мертвых клеток-мишеней с окраской 7-AAD и персистенцию CAR-Т с окраской EGFRt. В оставшиеся лунки добавляли свежее окрашенные CellTrace Violet клетки-мишени в том же количестве, что и в день 0. Тест выполняется в полной среде RPMI1640 с 10% ЭТС в отсутствие цитокинов. Истощение Т-клеток оценивали на 8-е сутки после окраски эффекторов TIM-3 (PE), TIGIT (PC7), PD1 (APC-750).

Статистика

Статистическую обработку данных проводили в программах GraphPad Prism 8.0 и R-статистика. Для сравнения различий по активации и цитотоксической активности использовался t-тест для независимых выборок (при равенстве дисперсий) и критерий Уэлча (при неравенстве дис-

персий двух групп). Значение $p < 0,05$ считали значимым для статистических выводов.

Результаты

Экспрессия GD2 на клетках нейробластомы пациентов

Маркер GD2 входит в диагностическую панель для анализа минимальной остаточной болезни и оценки поражения костного мозга (КМ) в типичном для НБ фенотипе $CD45^-$, $CD56^+$, $CD81^+$, $GD2^+$, $B7-H3^+$. Типичный пример выделения региона опухолевых клеток показан на рисунке 1. Материалом для анализа являлась опухолевая ткань с подозрением на НБ и костный

мозг пациентов с подтвержденным диагнозом. Поражение было в 33 образцах от 29 пациентов при первичном диагнозе или рецидиве заболевания (15 образцов КМ и 18 опухолевой ткани). Для ткани содержание опухолевых клеток оценивалось в интервале 0,61-91% (медиана 23%). Все образцы ткани НБ были положительны по GD2 (100%). Из 15 образцов КМ 3 были негативны по GD2 (20%). Содержание $GD2^+$ клеток в пораженном КМ пациентов составляло 0-73% (медиана 0,3%). $GD2^-$ образцы КМ содержали 0,2%, 0,04% и 0,09% атипичных клеток, таким образом, отсутствие экспрессии GD2 связано с низкой опухоле-

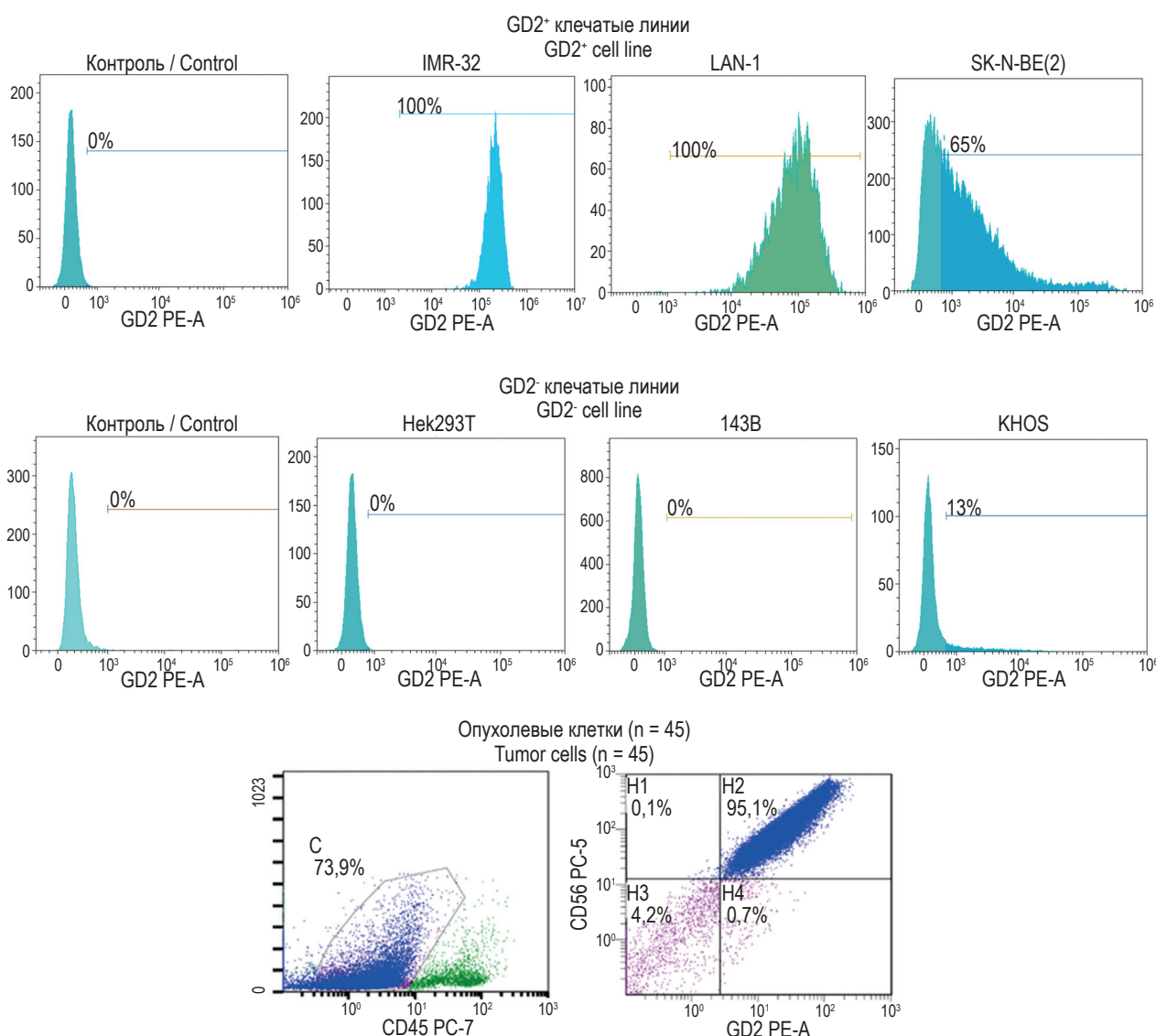


Рисунок 1. Экспрессия GD2 на клеточных линиях нейробластомы, остеосаркомы и опухолевых клетках пациентов с гистологически подтвержденной нейробластомой

Figure 1. Expression of GD2 on neuroblastoma, osteosarcoma cell lines and tumor cells from patients with histologically confirmed neuroblastoma

вой нагрузкой или недостаточным количеством материала.

Экспрессия GD2 на модельных клеточных линиях

Мы оценили экспрессию GD2 на трех клеточных линиях НБ, двух клеточных линиях остеосаркомы и одной неопухолевой клеточной линии с помощью проточной цитометрии. Клеточные линии НБ LAN-1 и IMR-32 были 100% положительными по GD2 с высокой интенсивностью экспрессии ($\Delta\text{MFI} = 2 \times 10^5$). Клеточная линия SK-N-BE(2) обладала низкой экспрессией, 65% GD2^+ , $\Delta\text{MFI} = 2 \times 10^3$. Клетки остеосаркомы 143В были полностью негативны по экспрессии GD2, клетки HEK293T и KHOS отрицательны с содержанием 5% и 13% слабоположительных GD2-клеток соответственно (рис. 1). Далее, мы использовали клетки LAN-1 как GD2^+ мишени и 143В как GD2- контроль для большинства тестов функциональной активности CAR-T-клеток.

Дизайн химерных антигенных рецепторов

Было разработано 5 вариантов анти-GD2 конструкций CAR второго поколения, с включением в качестве антиген-распознающего домена scFv трех моноклональных антител — 14G2a, 8B6 и hu3F8. Все варианты рецепторов включали шарнирный регион IgG4, трансмембранный домен CD28TM, внутриклеточный костимуляторный домен 4-1BB и сигнальный домен $\text{CD3}\zeta$. В конце через пептид 2A разместили транскрибированный вариант EGFRt в качестве белковой метки для мониторинга CAR-T-клеток. Вариации в конструкции рецептора были внесены путем добавления вставочных иммуноглобулиновых доменов CH2-CH3 между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом (L) или без него (S) (рис. 2, см. 3-ю стр. обложки).

Активация с GFP-репортерными клетками

В результате теста произошло успешное распознавание антигена, и через CAR проходил сигнал, который индуцировал экспрессию зеленого флуоресцентного белка (GFP). Свечение CAR^+ Jurkat-NFAT-GFP-репортеров в отсутствие клеток мишеней отражал тонический сигнал, неспецифический по отношению к антигену, off-target распознавание или самоактивацию рецептора (рис. 3, см. 3-ю стр. обложки).

Тонический сигнал для всех рецепторов сохранялся на низком уровне до 10%, примерно соответствующему неспецифическому сигналу от GD2- клеток-мишеней (HeLa, 143В). Наибольший тонический и неспецифический сигнал наблюдался для рецептора 8B6-BBz (L). Специфическая активация в тесте с GD2^+ положительными клетками-мишенями (SK-N-BE(2),

IMR-32 и LAN1) выражалась в кратном проросте GFP^+ CAR-репортеров.

При попарном сравнении длинных (L) и коротких (S) вариантов рецепторов с антителом 14g2a короткий вариант демонстрировал большую активацию для вариантов с антителом 8B6 без достоверных отличий. Сравнение CAR на основе разных антител показал преимущество 14g2a и hu3F8 над 8B6 по всем GD2^+ мишеням. Рецептор hu3F8-BBz (L) близок к 14G2a-BBz (S), но имеет тенденцию к лучшей активации на клетках BE(2) со сниженной экспрессией GD2.

Фенотип анти-GD2 CAR-T-клеток

Спустя 14 дней культивирования для каждого варианта анти-GD2 CAR-T и нетрансдуцированных Т-клеток (МОСК-контроль) оценивали уровень трансдукции и дифференцировочный фенотип методом проточной цитометрии. Содержание CD3^+ клеток в продукте всегда превышало 90% (92-99%). Соотношение $\text{CD4}/\text{CD8}$ при используемом методе селекции и экспансии клеток составило в среднем 2:1, с вариацией для CD4^+ клеток 55-60%, CD8^+ клеток 37-44%. Уровень трансдукции по маркеру tEGFR составил 20-35% (медиана 27%).

Дифференцированная зрелость CAR-T клеток оценивалась по четырем маркерам CD45RO , CCR7 , CD62L , CD95 с выделением этапов наивных Т-клеток (Tnaiv) и стволовых клеток памяти (Tscm), центральной памяти (Tcm), периферической памяти (Ttm) и терминальных эффекторов (Teff) (рис. 4). Сравнительным показателем, характеризующим сохранением пролиферативного потенциала является суммарный уровень CCR7^+ «ранних» клеток ($\text{Tnaiv} + \text{Tscm} + \text{Tcm}$). МОСК-контроль сохранял уровень CCR7^+ 22% для CD4 -клеток и 21% для CD8 -клеток. CAR-T-клетки имели сходный профиль дифференцированной зрелости — CCR7^+ 22,6-31,5% для CD4 -клеток и 21,7-26,3% для CD8 -клеток.

Тест на определение экспрессии маркера CD107a

CD107a (LAMP-1, lysosomal associated membrane glycoprotein) является белком мембраны литических гранул, содержащих гранзим и перфорин. При активации цитотоксических клеток происходит высвобождение содержимого таких гранул (дегрануляция) и в этот момент CD107a обнаруживается на поверхности клетки [23, 24]. Таким образом, уровень CD107a является показателем цитотоксической активности CAR-T-лимфоцитов.

Проведенный тест показал, что при инкубации CAR-T-клеток с мишенями, дегрануляция CAR-T-клеток происходит GD2-зависимым образом (с LAN-1 более, чем с 143В) для CAR-T с распознающим доменом 14G2a и hu3F8, но не

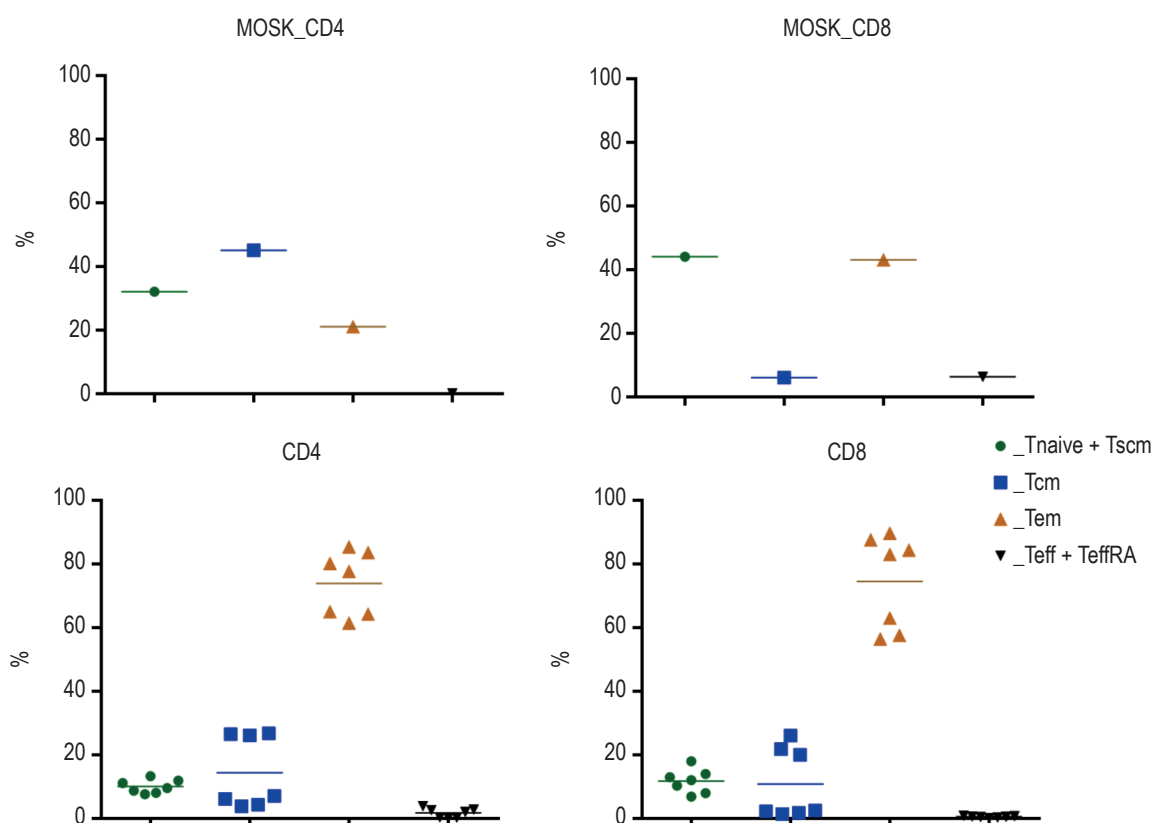


Рисунок 4. Популяционный состав МОСК-контроля и CAR-T-клеток в конце инкубации

Figure 4. Population composition of MOCK-control and CAR-T cells at the end of incubation

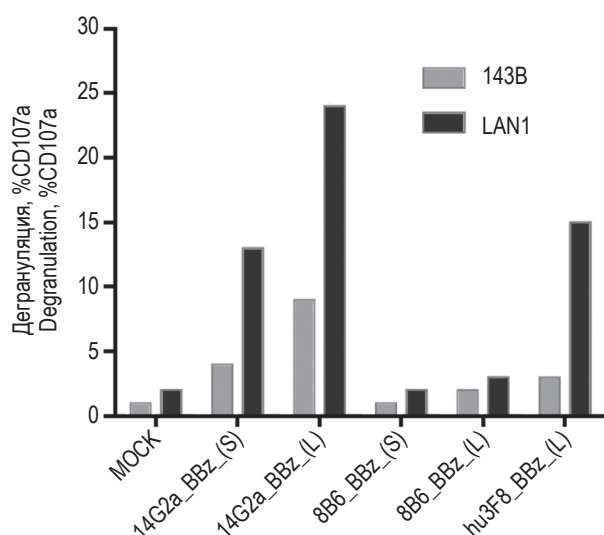


Рисунок 5. Экспрессия CD107a в присутствии опухолевых клеточных линий

Figure 5. Expression of CD107a in the presence of tumor cell lines

8B6, которое в данных условиях теста не отличается от МОСК-контроля. Для 14G2a CAR-T-клеток существенно более высокая дегрануляция показана для «длинного» варианта рецептора (L) со вставочными доменами (рис. 5).

Цитотоксическая активность анти-GD2 CAR-T-клеток

Прямой цитотоксический тест проводили в соотношениях эффектор:мишень = 2:1, 1:1, 1:2 со всеми пятью вариантами CAR-T. Для представления CAR-зависимой цитотоксичности конечные результаты рассчитывались как разница ЦТА CAR-T и соответствующего ему МОСК-контроля (рис. 6).

Все варианты CAR-T показали выраженную доза-зависимую цитотоксическую активность против GD2⁺ клеточной линии LAN-1, но не GD2⁻ линии 143B. Для рецептора 14G2a-BBz (L) ЦТА превосходит 14G2a-BBz (S), достоверно для соотношения 2:1 ($p = 0,013$). Цитотоксическая активность рецептора 8B6-BBz (L) также превосходит короткий вариант 8B6-BBz (S) рецептора ($p < 0,03$ для соотношений 2:1 и 1:1). Длинный

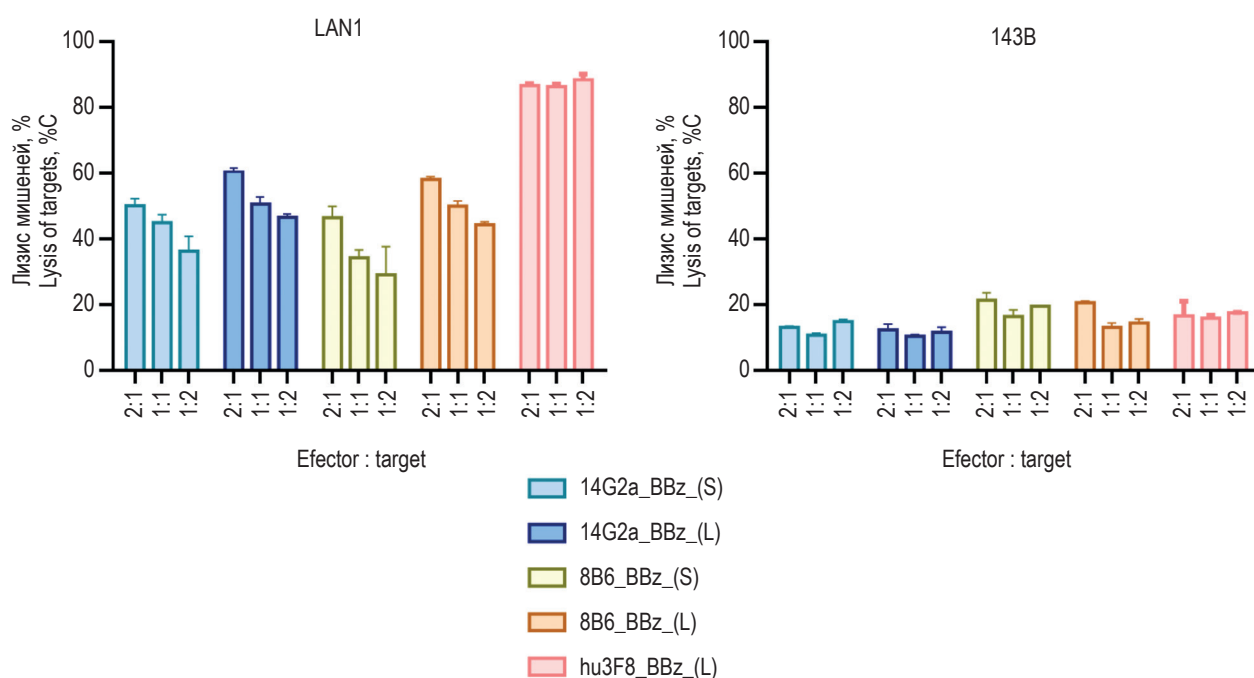


Рисунок 6. Сравнение цитотоксической активности всех вариантов CAR-T_Anti-GD2 против клеточной линии LAN1 и 143B в трех разных соотношениях

Figure 6. Comparison of cytotoxic activity of all CAR-T_Anti-GD2 variants against LAN1 and 143B cell line in three different ratios

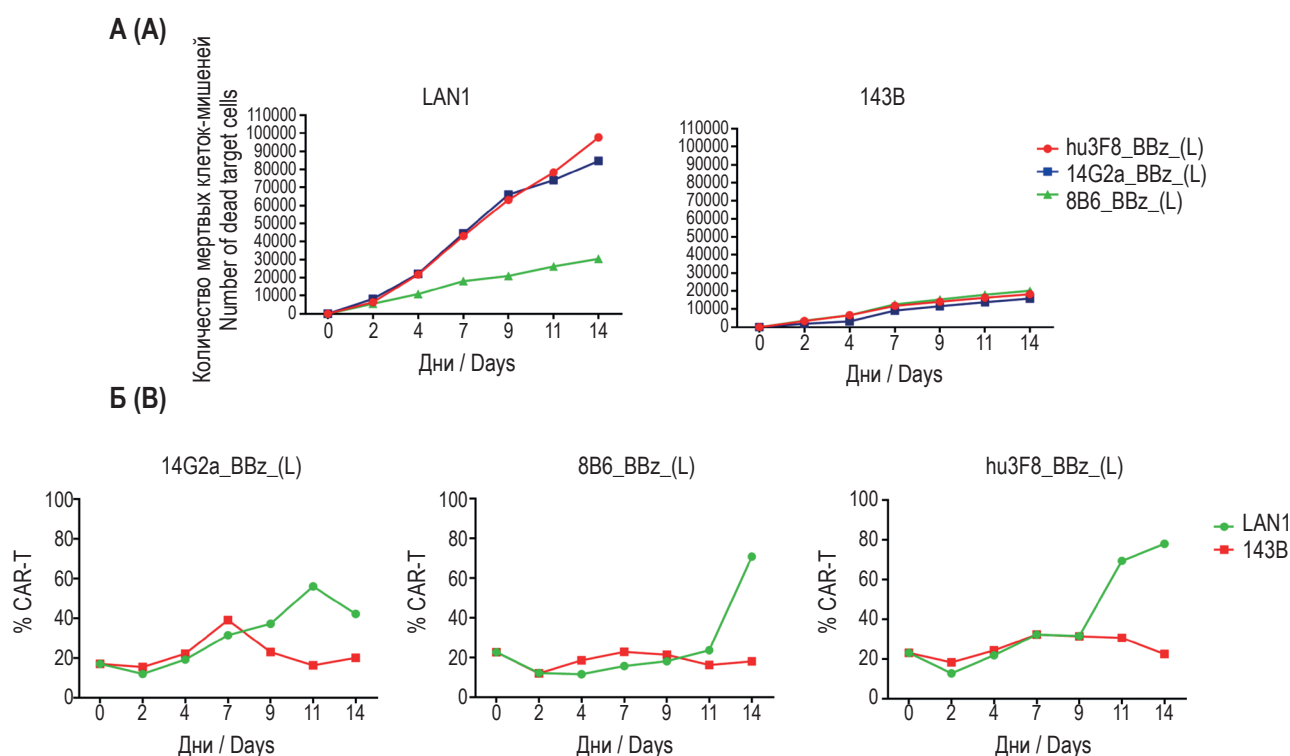


Рисунок 7. Цитотоксическая активность трех вариантов CAR-T_Anti-GD2 в тесте на рестимуляцию против клеточной линии LAN1 и 143B

Примечание. А – график накопления мертвых клеток-мишеней. Б – график персистенции CAR-T.

Figure 7. Cytotoxic activity of three CAR-T_Anti-GD2 variants in the restimulation test against LAN1 and 143B cell line

Note. A, graph of dead target cells accumulation. B, graph of CAR-T persistence.

вариант 14G2a-BBz обладает достоверно более высокой ЦТА чем 8B6-BBz (L). Наибольшей ЦТА обладает рецептор на основе антитела hu3F8 ($p < 0,001$ против всех).

Истощение CAR-T-клеток и контроль мишеней в тесте с рестимуляцией

Тест на истощение отличается от прямого цитотоксического теста длительностью и регулярным добавлением мишеней в течение 14 дней. Тест позволяет оценить способность CAR-T-клеток к экспансии, контролю большой опухолевой нагрузки и приобретению фенотипа истощения. Для данного теста были использованы варианты рецепторов (L) со вставочными доменами.

Результаты теста показали, что в тесте рецепторы 14G2a-BBz (L) и hu3F8-BBz (L) на протяжении двух недель обеспечивали полный контроль клеток-мишеней, с гибелью более 90% клеток LAN-1 во всех временных точках. Рецептор 8B6-BBz (L) обеспечил киллинг половины клеток мишеней на 2-е сутки, но затем ЦТА упала на уровень ниже 10%. Дальнейшая динамика показала еще больший отрыв ЦТА рецепторов 14G2a-BBz (L) и hu3F8-BBz (L), которые к 14-му дню показали трехкратное преимущество перед 8B6-BBz (L) в кумулятивной гибели мишеней LAN-1. В тесте с мишенями 143B со всеми тремя рецепторами количество мертвых клеток-мишеней находилось на одинаково низком уровне (рис. 7А).

Тест не показал экспансии абсолютного количества CAR-T-клеток, но доля CAR⁺ клеток среди всех лимфоцитов в тесте имело разную динамику. Все три варианта CAR-T-клеток персистировали примерно одинаково в течение первой недели, с последующим приростом для 14G2a-BBz (до 60%) и hu3F8-BBz (до 80%) к 11 дню при инкубации с LAN-1. CAR-T-клетки 8B6-BBz (L) персистировали на уровне 10-20% живых клеток в течение 11 суток теста как с LAN-1, так и 143B. На 14-е сутки отмечен прирост 8B6-BBz CAR-T-клеток с обоими мишенями (рис. 7Б).

Мы так же оценили экспрессию маркеров иммунного истощения (TIM-3, TIGIT и PD1) Т-клеток после 8 дней культивирования с GD2⁺ (LAN1) и GD2⁻ (143B) клетками-мишенями. Повышение экспрессии TIM-3, TIGIT и PD1 отмечено для 14G2a-BBz и hu3F8-BBz в тесте с LAN-1 по сравнению с 143B (рис. 8).

Обсуждение

В последнее десятилетие в онкологии ознаменовалось большим успехом CAR-T-терапии. Первые клинические испытания CAR-T-

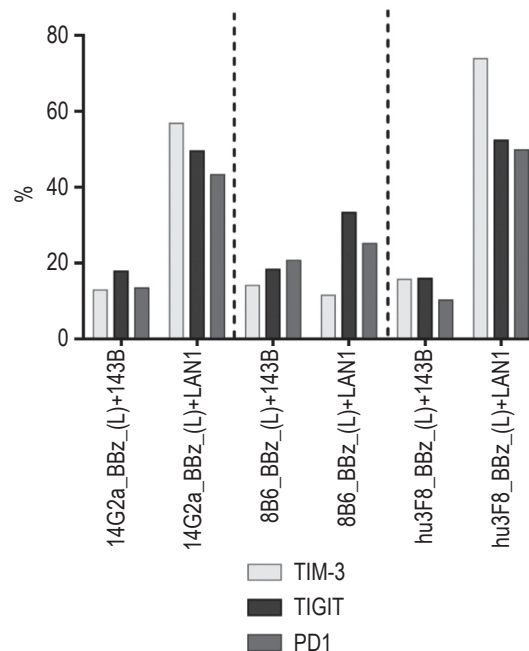


Рисунок 8. Маркеры истощения CAR-T-клеток на 8-е сутки совместного культивирования с клетками-мишенями (LAN-1 и 143B)

Figure 8. Markers of CAR-T cell depletion at 8 days of co-culture with target cells (LAN-1 and 143B)

терапии, нацеленные почти исключительно на дисаialogанглиозид GD2, показали скромный, но обнадеживающий результат. На сегодняшний день крайне актуальным является дальнейшее совершенствование метода в сторону большей безопасности и эффективности терапии. На уровне химерного антигенного рецептора, это обеспечивается специфичностью распознавания антигена, цитотоксической активностью CAR-T-клеток и антиген-зависимой персистенцией (экспансией) CAR-T-клеток.

В настоящей работе мы сравнивали функциональную активность CAR-T-клеток с тремя наиболее перспективными антиген-распознающими антителами: классическое антитело 14G2a (денутуксимаб), гуманизированное антитело hu3F8 (накситумаб) и альтернативное антитело 8B6 в составе CAR второго поколения с 4-1BB коstimуляторным доменом. Выбор распознающего модуля антитела до сих пор остается открытым, поскольку CAR, основанные на 14G2a- и hu3F8-антителах, показали сходный клинический результат, а 8B6 не использовался пока в клинических испытаниях в составе CAR. Открытым остается вопрос, насколько высокую аффинность к антигену должен иметь CAR для реализации наибольшего эффекта. Наибольшей аффинностью обладает hu3F8 ($K_D = 11\text{nM}$) [13], более низкой 14G2a ($K_D = 77\text{nM}$ [13] или 49 [2]).

Антитело 8B6 обладает промежуточной аффинностью ($K_D = 32$ [14]), но является более привлекательным из-за более высокой специфичности распознавания ацетилированной формы GD2, характерной для опухолевых клеток, но не периферических нервов [2].

Функциональная активность рецептора модулируется также длиной внеклеточной части рецептора, задаваемой вставочными иммуноглобулиновыми доменами CH2-CH3 встроенными между антительной частью рецептора и трансмембранным доменом. Ранее было показано, что для анти-CD19 CAR длинный спейсер мешает распознаванию антигена и противоопухолевой активности [9]. Для GD2, как правило, используют CAR с длинными спейсером, что, вероятно, обусловлено пространственным расположением антигена вблизи мембраны [17]. Недостатком включения иммуноглобулиновых Fc-доменов является их распознавание FcγRI (CD64) рецепторами макрофагов и ингибирование CAR-T-клеток. В нашем дизайне рецептора две мутации (L235E, N297Q) были внесены в IgG4 Fc для предотвращения распознавания Fc-рецепторами [10]. Короткие версии рецепторов 14G2a и 8B6 без вставочных доменов также испытывались на нашем исследовании.

Поскольку функциональная активность рецепторов зависит также от плотности экспрессии антигена на поверхности клеток, мы использовали несколько вариантов клеток-мишеней, отличающихся по уровню экспрессии GD2. Клеточные линии IMR-32 и LAN1 высоко экспрессировали GD2, НБ SK-N-BE(2) имела частичную экспрессию, клетки линий HEK293T и KHOS минимальный уровень экспрессии GD2, остеосаркома 143B была полностью GD2 негативна.

Тест на активацию с GFP-репортером точно отразил уровень экспрессии GD2 на клетках-мишенях. Наибольшая активация для всех вариантов рецептора была на клетках LAN1 и IMR-32, сниженная на клетках SK-N-BE(2), уровень активации всех вариантов CAR клетками HeLa и 143B сопоставим с тоническим сигналом. Интересно, что в данном тесте уровень активации мало зависит от длины спейсера, но отличается для разных антительных доменов. Так, активация 8B6 CAR достоверно ниже активации CAR-T-рецепторов на основе 14G2a и hu3F8. Рецептор на основе hu3F8 по активации превосходит 14G2a только на клетках SK-N-BE(2) с низкой экспрессией GD2.

Цитотоксическая активность всех вариантов CAR-T-клеток реализовывалась на клетках LAN1, но не 143B. При этом фиксируется достоверно более высокая цитотоксическая актив-

ность для CAR-T с длинными вариантами рецептора 14G2a и 8B6. Таким образом, подтверждается преимущество длинного спейсера для разных вариантов анти-GD2 рецепторов. Длинный вариант рецептора на основе hu3F8 показал наилучшие результаты цитотоксической активности превосходящей оба других антитела.

Гибель клеток мишеней в цитотоксическом тесте оказалась конкордантной экспрессии маркера дегрануляции CD107a на CAR-T-клетках. Рецепторы на основе 8B6-антитела имели минимальный уровень CD107a не отличимый от МОСК-контроля. Варианты CAR с 14G2a и hu3F8 достоверно повышали экспрессию CD107a при инкубации с LAN1 мишенями, но не 143B клетками. Рецептор 14G2a-BBz (L) повышал экспрессию почти вдвое больше варианта короткого рецептора 14G2a-BBz (L).

Маркеры истощения CAR-T-клеток TIM-3, TIGIT и PD-1 на 8-е сутки совместного культивирования с клетками-мишенями показали схожие результаты с максимальной экспрессией на CAR-T-клетках с длинными вариантами 14G2a и hu3F8 рецепторов. Экспрессия этих маркеров имеет двойственное значение. С одной стороны, маркеры истощения отражают уровень активации CAR-T-лимфоцитов, сопровождающей их функциональную активность. С другой стороны, высокие показатели маркеров истощения приводят к ингибированию и в конце концов гибели Т-клеток. При равном уровне активации и цитотоксической активности преимущество будут иметь CAR-T-клетки с меньшей индукцией маркеров истощения [8]. По нашим данным, hu3F8-BBz рецептор показал несколько более высокую активацию, чем 14G2a-BBz.

Три варианта CAR с наличием вставочных внеклеточных доменов рецептора сравнивались в финальном эксперименте на истощение с рестимуляцией клетками мишенями LAN1 и 143B. Этот эксперимент наиболее полно демонстрирует способность ограниченного количества CAR-T-клеток контролировать большое количество клеток-мишеней, а также пролиферировать в их присутствии. В отличие от короткого цитотоксического теста длительный тест показал неспособность рецептора 8B6-BBz контролировать клетки-мишени LAN1. 14G2a-BBz (L) и hu3F8-BBz (L) обеспечили уничтожение клеток мишеней LAN1 в течение 2 недель с небольшим лидерством hu3F8-BBz после 10-го дня. В тесте с GD2-негативными клетками 143B гибель мишеней сохранялась на стабильно низком уровне, накапливались живые мишени.

Интересно, что отличие от подобных тестов с рестимуляцией для анти-CD19 CAR, в нашем исследовании не происходила экспансия анти-

GD2 CAR-T-клеток в течение всего времени теста на уровне, превышающем исходное содержание CAR-T. В течение первой недели во всех тестах, как с LAN1, так и 143B, происходило небольшое увеличение доли CAR-T-клеток среди лимфоцитов за счет гибели нетрансдуцированных лимфоцитов. На 9-й день для 14G2a-BBz и hu3F8-BBz и на 11-й день 8B6-BBz CAR-T-клеток произошел скачок с персистенции CAR-T-клеток в культуре с LAN1 в отличие от культуры с 143B, где CAR-T гибли наряду с нетрансдуцированными лимфоцитами. К концу эксперимента наибольшее содержание CAR-T-клеток (около 80%) сохранилось для hu3F8-BBz, и что неожиданно, для 8B6-BBz (около 70%), за счет резкого прироста количества 8B6-BBz CAR-T-клеток с 11-х по 14-е сутки. Подобный прирост 8B6-BBz CAR-T-клеток можно объяснить замедленной активацией Т-клеток с этим рецептором. Персистенция и тем более экспансия CAR-T в ответ на стимуляцию антигеном является важнейшим фактором

их клинической эффективности [20] при условии сохранения высокого уровня цитотоксической активности.

Заключение

Обобщая все полученные результаты, мы показали, что среди анти-GD2 CAR второго поколения с 4-1BB сигнальным доменом, наилучшую противоопухолевую активность демонстрирует hu3F8-BBz с длинными внеклеточным спейсером, выигрывающий у 14G2a-BBz по цитотоксической активности и распознаванию клеток со сниженным уровнем экспрессии GD2. Наихудшие показатели цитотоксической активности и активации показал рецептор 8B6-BBz. Тем не менее более высокая специфичность 8B6-антитела в отношении опухолевых клеток обладает потенциальным преимуществом, но для его реализации в виде CAR-T, очевидно, требуется изменение конструкции с целью увеличения аффинности и мультипликации внутриклеточного сигнала.

Список литературы / References

1. Пролесковская И.В., Конопля Н.Е., Быданов О.И. Терапия рецидивов/прогрессии болезни у пациентов с нейробластомой в Республике Беларусь за 20-летний период: когортное исследование // Российский журнал детской гематологии и онкологии, 2019. Т. 6, № 4. С. 40-47. [Proleskovskaya I.V., Konoplya N.E., Bydanov O.I. Treatment of relapse/progression of the disease in patients with neuroblastoma in the Republic of Belarus over a 20-year period: a cohort study. *Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii = Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*, 2019, Vol. 6, no. 4, pp. 40-47. (In Russ.)]
2. Alvarez-Rueda N., Desselle A., Cochonneau D., Chaumette T., Clemenceau B., Leprieur S., Bougras G., Supiot S., Mussini J.-M., Barbet J., Saba J., Paris F., Aubry J., Birklé S. A monoclonal antibody to O-Acetyl-GD2 ganglioside and not to GD2 shows potent anti-tumor activity without peripheral nervous system cross-reactivity. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 9, e25220. doi: 10.1371/journal.pone.0025220.
3. Cavdarli S., Delannoy P., Groux-Degroote S. O-acetylated gangliosides as targets for cancer immunotherapy. *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 3, 741. doi: 10.3390/cells9030741.
4. Del Bufalo F., De Angelis B., Caruana I., del Baldo G., De Ioris M.A., Serra A., Mastronuzzi A., Cefalo M.G., Pagliara D., Amicucci M., Pira G.L., Leone G., Bertaina V., Sinibaldi M., Di Cecca S., Guercio M., Abbaszadeh Z., Iaffaldano L., Gunetti M., Iacovelli S., Bugianesi R., Macchia S., Algeri M., Merli P., Galaverna F., Abbas R., Garganese M.C., Villani M.F., Colafati G.S., Bonetti F., Rabusin M., Perruccio K., Folsi V., Quintarelli C., Locatelli F.; Precision Medicine Team-IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù. GD2-CART01 for Relapsed or Refractory High-Risk Neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.*, 2023, Vol. 388, no. 14, pp. 1284-1295.
5. Faraj S., Bahri M., Fougeray S., El Roz A., Fleurence J., Véziers J., Leclair M.D., Thébaud E., Paris F., Birklé S. Neuroblastoma chemotherapy can be augmented by immunotargeting O-acetyl-GD2 tumor-associated ganglioside. *Oncoimmunology*, 2018, 7, no. 1, e1373232. doi: 10.1080/2162402X.2017.1373232.
6. Furman W.L. Monoclonal antibody therapies for high risk neuroblastoma. *Biologics*, 2021, Vol. 15, pp. 205-219.
7. Fleurence J., Fougeray S., Bahri M., Cochonneau D., Clémenceau B., Paris F., Heczey A., Birklé S. Targeting O-Acetyl-GD2 ganglioside for cancer immunotherapy. *J. Immunol. Res.*, 2017, Vol. 2017, 5604891. doi: 10.1155/2017/5604891.
8. Harush O., Asherie N., Kfir-Erenfeld S., Adler G., Barliya T., Assayag M., Gatt M.E., Stepensky P., Cohen C.J. Preclinical evaluation and structural optimization of anti-BCMA CAR to target multiple myeloma. *Haematologica*, 2022, Vol. 107, no. 10, pp. 2395-2407.
9. Hudecek M., Sommermeyer D., Kosasih P.L., Silva-Benedict A., Liu L., Rader C., Jensen M.C., Riddell S.R. The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. *Cancer Immunol. Res.*, 2015, Vol. 3, no. 2, pp. 125-135.
10. Jonnalagadda M., Mardiros A., Urak R., Wang X., Hoffman L.J., Bernanke A., Chang W.-C., Bretzlaff W., Starr R., Priceman S., Ostberg J.R., Forman S.J., Brown C.E. Chimeric antigen receptors with mutated IgG4 Fc spacer avoid Fc receptor binding and improve T cell persistence and antitumor efficacy. *Mol. Ther.*, 2015, Vol. 23, no. 4, pp. 757-768.

11. June C.H., O'Connor R.S., Kawalekar O.U., Ghassemi S., Milone M.C. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*, 2018, Vol. 359, no. 6382, pp. 1361-1365.
12. Lutskovich D., Meleshko A., Katsin M. State of the art and perspectives of chimeric antigen receptor T cells cell therapy for neuroblastoma. *Cytotherapy*, 2024, Vol. 26, no. 10, pp. 1122-1131.
13. Mao R., Kong W., He Y. The affinity of antigen-binding domain on the antitumor efficacy of CAR T cells: Moderate is better. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 1032403. doi: 10.3389/fimmu.2022.1032403.
14. Nazha B., Inal C., Owonikoko T.K. Disialoganglioside GD2 Expression in Solid Tumors and Role as a Target for Cancer Therapy. *Front. Oncol.*, 2020, Vol. 10, 1000. doi: 10.3389/fonc.2020.01000.
15. Peinemann F., van Dalen E.C., Enk H., Tytgat G.A.M. Anti-GD2 antibody-containing immunotherapy postconsolidation therapy for people with high-risk neuroblastoma treated with autologous haematopoietic stem cell transplantation. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2019, Vol. 4, no. 4, CD012442. doi: 10.1002/14651858.CD012442.pub2.
16. Qian K., Li G., Zhang S., Fu W., Li T., Zhao J., Lei C., Wang Y., Hu S. CAR-T-cell products in solid tumors: Progress, challenges, and strategies. *Interdiscip. Med.*, 2024, Vol. 2, e20230047. doi: 10.1002/INMD.20230047.
17. Thomas S., Straathof K., Himoudi N., Anderson J., Pule M. An optimized GD2-targeting retroviral cassette for more potent and safer cellular therapy of neuroblastoma and other cancers. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 3, e0152196. doi: 10.1371/journal.pone.0152196.
18. Terme M., Dorvillius M., Cochonneau D., Chaumette T., Xiao W., Diccianni M.B., Barbet J., Yu A.L., Paris F., Sorkin L.S., Birkle S. Chimeric antibody c8B6 to O-acetyl-GD2 mediates the same efficient anti-neuroblastoma effects as therapeutic ch14.18 antibody to GD2 without antibody induced allodynia. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 2, e87210. doi: 10.1371/journal.pone.0087210.
19. Wang V., Gauthier M., Decot V., Reppel L., Bensoussan D. Systematic Review on CAR-T cell clinical trials up to 2022: academic center input. *Cancers*, 2023, Vol. 15, no. 4, 1003. doi: 10.3390/cancers15041003.
20. Wittibschlager V., Bacher U., Seipel K., Porret N., Wiedemann G., Haslebacher C., Hoffmann M., Daskalakis M., Akhoundova D., Pabst T. CAR T-cell persistence correlates with improved outcome in patients with B-cell lymphoma. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 6, 5688. doi: 10.3390/ijms24065688.
21. Yan P., Qi F., Bian L., Xu Y., Zhou J., Hu J., Ren L., Li M., Tang W. Comparison of incidence and outcomes of neuroblastoma in children, adolescents, and adults in the united states: A Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program population study. *Med. Sci. Monit.*, 2020, Vol. 26, e927218. doi: 10.12659/MSM.927218.

Авторы:

Луцкович Д.В. — научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», д. Боровляны, Минская обл., Республика Беларусь

Керезь М.А. — младший научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», д. Боровляны, Минская обл., Республика Беларусь

Клыч А.В. — научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», д. Боровляны, Минская обл., Республика Беларусь

Луцкович Е.С. — младший научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», д. Боровляны, Минская обл., Республика Беларусь

Мелешко А.Н. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», д. Боровляны, Минская обл., Республика Беларусь

Authors:

Lutskovich D.V., Researcher, Laboratory of Genetic Biotechnology, Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany village, Minsk Region, Republic of Belarus

Keraz M.A., Junior Researcher, Laboratory of Genetic Biotechnology, Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany village, Minsk Region, Republic of Belarus

Klych H.V., Researcher, Laboratory of Genetic Biotechnology, Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany village, Minsk Region, Republic of Belarus

Lutskovich E.S., Junior Researcher, Laboratory of Genetic Biotechnology, Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany village, Minsk Region, Republic of Belarus

Meleshko A.N., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Genetic Biotechnology, Scientific Department, Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany village, Minsk Region, Republic of Belarus

Поступила 20.12.2024
Отправлена на доработку 27.12.2024
Принята к печати 23.03.2025

Received 20.12.2024
Revision received 27.12.2024
Accepted 23.03.2025