

На правах рукописи

Украинская Валерия Михайловна

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ НА
ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ АКТИВНОСТЬ CAR T-КЛЕТОК**

Автореферат диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

1.5.3. Молекулярная биология

**Москва
2021**

Работа выполнена в лаборатории биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель:

Степанов Алексей Вячеславович, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Купраш Дмитрий Владимирович, д.б.н., профессор, чл.-корр. РАН, заведующий Центром высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Ефимов Григорий Александрович, к.б.н., заведующий лабораторией трансплантационной иммунологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства.

Защита состоится «22» декабря 2021 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва В-437, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. Академиков М. М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан « » 2021 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

доктор физико-математических наук



Олейников В.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время в терапии онкологических заболеваний происходит смещение фокуса на использование собственных ресурсов организма, в частности, Т-клеток, модифицированных химерным антигенным рецептором. CAR Т-клетки уже доказали свою эффективность при лечении диффузных видов рака. Однако, несмотря на высокую эффективность адоптивной иммунотерапии, которая часто является терапией последней надежды, в ряде случаев функция CAR Т-клеток оказывается снижена под действием иммуносупрессивного опухолевого микроокружения. В современной литературе существуют указания на то, что внеклеточные везикулы, выделяемые опухолями, могут быть важным фактором в формировании иммуносупрессорного микроокружения. Действие везикул может, по крайней мере частично, объяснить резистентность к терапии и фенотипические изменения в клетках опухоли, индуцированные химио- и радиотерапией. Поскольку действие опухолевых внеклеточных везикул (EV) на клетки иммунитета, в частности, Т-клетки и терапевтические CAR Т-клетки изучено слабо, характеристика EV и идентификация молекулярных механизмов, лежащих в основе их связывания и биологического эффекта, является актуальной с научной и практической точки зрения задачей. В свою очередь, существует целый ряд проблем, связанных с получением качественного CAR Т-клеточного продукта. Особенно, актуальность корректной и эффективной экспансии Т-клеток после модификации возникает при получении CAR продукта с помощью электропорации плазмидными векторами, кодирующими CAR и транспозазы, либо CRIPSR/Cas9. Искусственные везикулы, несущие опухолевые антигены, могут выступать в роли активирующих частиц, которые позволяют наработать CAR-Т продукт с корректным фенотипом, большим количеством терапевтического продукта и высоким процентом живых клеток.

Кроме везикул в опухолевом микроокружении присутствуют и другие компоненты, такие как нейтрофилы и образуемые ими внеклеточные сети, которые подавляют активность иммунных клеток. Накопленные данные свидетельствуют о том, что выбрасываемые нейтрофилами внеклеточные ловушки являются важными участниками процесса прогрессирования некоторых раковых опухолей. Таким образом, изучение

микроокружение опухоли может потенциально расширить фундаментальные представления о развитии опухолевых заболеваний и предложить новые мишени и подходы противоопухолевой терапии.

Цель и задачи исследования. Целями данной работы являлось изучение влияния факторов опухолевого микроокружения, включая внеклеточные везикулы, на Т-клетки, модифицированные химерными антигенными рецепторами (CAR-T) и выяснение возможности применения искусственных антигенных везикул (AV) для специфической стимуляции и получения в культуре CAR Т-клеток. Для решения данных целей были поставлены следующие задачи:

- Выделить и охарактеризовать экзосомы глиомных и лимфомных клеток.
- Изучить зависимость взаимодействия CAR Т-клеток с везикулами от антиген-специфического распознавания опухолевого маркера везикул химерными рецепторами.
- Изучить влияние опухолевых везикул на функциональную активность CAR Т-клеток.
- Разработать метод получения искусственных антигенных везикул (AV, antigenic vesicles), несущих поверхностные антигены опухолей и флуоресцентные маркеры.
- Показать возможность использования искусственных антигенных везикул для детекции CAR Т-клеток.
- Оценить применимость искусственных антигенных везикул для специфической стимуляции и получения в культуре CAR Т-клеток *in vitro*.
- Сравнить терапевтический потенциал CAR Т-клеток, полученных классическими методами и при стимуляции AV *in vivo*.
- Изучить возможность применения мутантной ДНКазы I для подавления метастазирования и прогрессирования опухоли, связанного с образованием внеклеточных ловушек нейтрофилов.

Научная новизна и практическая значимость работы. В данной работе впервые подробно охарактеризовано взаимодействие опухолевых экзосом, выделенных из клеток лимфом и глиом с CAR Т-клетками и показано их влияние на активность CAR-T в

зависимости от присутствия опухолевого антигена (CD19 или IL13R2a) на поверхности экзосом. Также нами было показано, что опухолевые экзосомы из клеток лимфом могут, в зависимости от концентрации, как активировать, так и подавлять, функцию CAR T-клеток, влияя на секрецию воспалительных цитокинов и изменяя профиль экспрессии генов CAR T-клеток. Кроме того, в данной работе описан новый способ получения искусственных антигенных везикул, несущих опухолевый антиген для детекции химерного антигенного рецептора на поверхности T-клеток. Доказано, что эти везикулы можно с успехом применить для идентификации, активации и экспансии CAR-положительной популяции T-клеток.

Также, исходя из полученных результатов, можно утверждать, что опосредованный AAV перенос гена ДНКазы I, позволяет эффективно бороться с NET, и кроме того может сбалансировать врожденный и адаптивный иммунный ответ в микроокружении опухоли, восстановив иммунный контроль над раковыми клетками.

Данные результаты являются новыми, в литературе пока отсутствуют работы, сообщающие о сходных или одинаковых с нашими результатами по исследованию влияния опухолевых внеклеточных везикул на CAR-T клетки. Таким образом, можно констатировать, что оригинальность проведенных исследований очень высока.

Публикации и апробация работы. По теме работы опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах из списка ВАК, имеется 1 патент. Результаты работы были представлены на 2-х конференциях: XXXIV зимняя молодежная научная школа (2021, Москва, Россия), 45-й конгресс FEBS (2021, Slovenia, Ljubljana).

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация изложена на 118 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список литературы и приложение. Материал иллюстрирован 35 рисунками и 4-мя таблицами. Библиографический указатель включает ссылки на 158 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Изучение влияния экзосом EV на противоопухолевую активность CAR T-клеток

В качестве объектов исследования влияния опухолевых экзосом на модифицированные лимфоциты были выбраны CAR T-клетки для терапии лимфом и лейкозов (CD19-CAR), а также глиобластомы (IL-13-CAR). Для проведения функциональных экспериментов нами были получены репортерные линии клеток лимфомной (Nalm-6) и глиомной (U87) линий, несущие ген нанолюциферазы, слитый с тетраспанином CD63. Также, для получения адекватного отрицательного контроля, в клетках Nalm-6 был проведен нокаут гена CD19, для получения CD19-негативных клеток и, соответственно, везикул.

Для анализа потенциального влияния внеклеточных везикул на функции CAR T-клеток, CAR T-клетки инкубировали с разными экзосомами и измеряли уровень хемилюминесценции нанолюциферазы (Рис. 1). Из полученных данных можно видеть, что экзосомы избирательно связываются и поглощаются CAR T-клетками (наблюдается избирательная аффинность EV Nalm-6 к CD19-CAR, а глиомных экзосом к IL13-CAR T-клеткам).

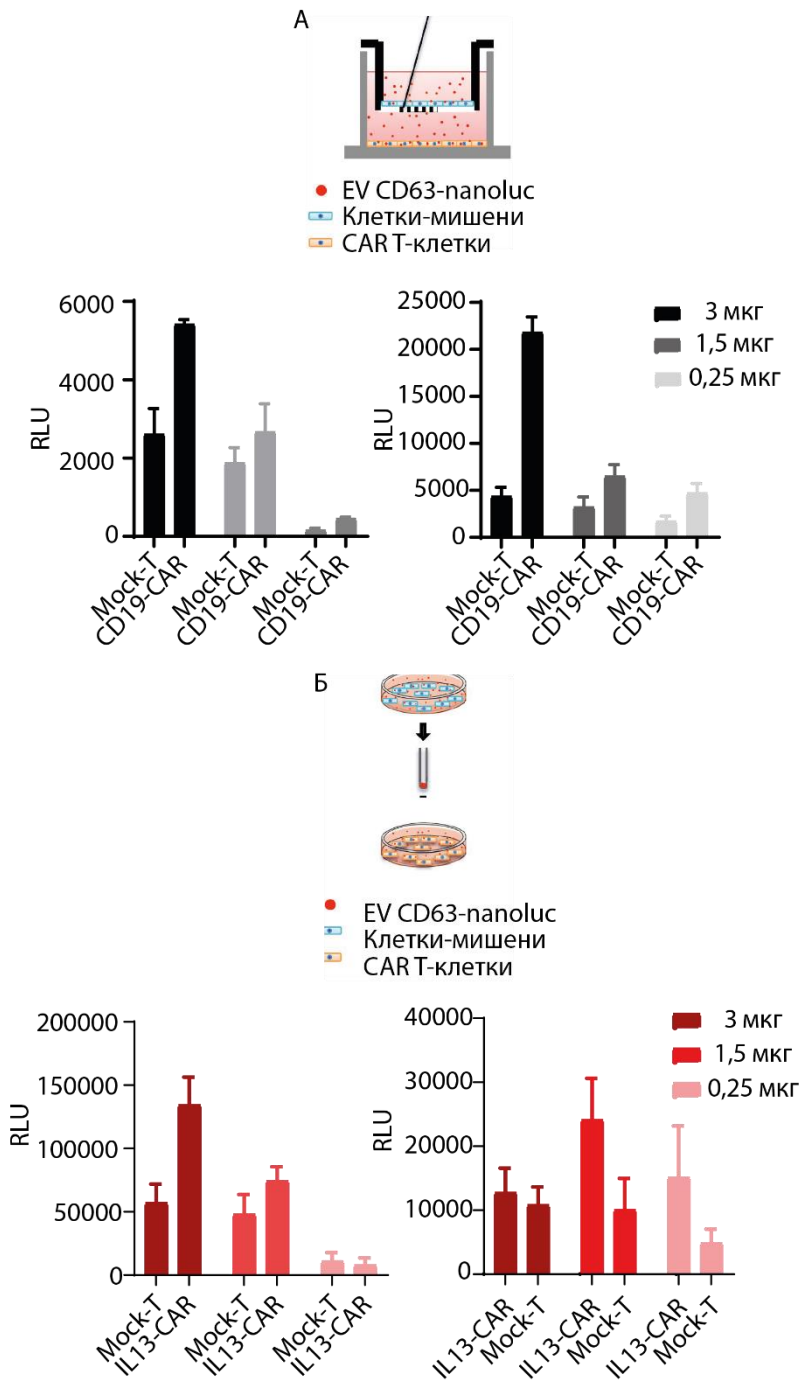


Рисунок 1. Экзосомы (EV), содержащие на поверхности CD19 и IL-13mut связывают CD19-CAR и IL13-CAR при инкубации продуцирующими их клетками Nalm-6 (CD19) и U87 (IL13Ra2) с соответствующими CAR T-клетками в эксперименте “transwell” (А) и при непосредственном контакте между CAR T-клетками и очищенными экзосомами (Б).

Чтобы определить, происходит ли при связывании везикул с клетками и их интернализация (и, возможно, передача содержимого везикул клеткам-реципиентам), нами были получены конфокальные изображения CAR T-клеток, предварительно проинкубированных с EV. Результаты микроскопии представлены на Рисунке 2, и демонстрируют избирательное связывание EV CD19⁺ и их поглощение только теми клетками, которые несут на поверхности CD19-CAR.

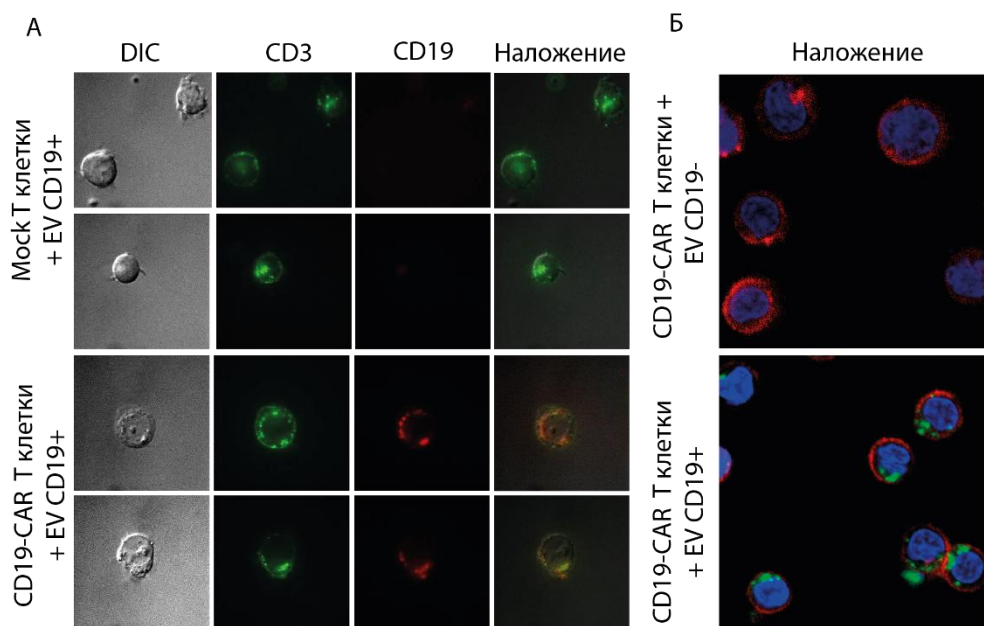


Рисунок 2. Конфокальное изображение CAR T-клеток, обработанных EV. А – Конфокальное изображение клеток Jurkat/Jurkat-CD19-CAR, инкубированных с CD19⁺ экзосомами. (красный - CD19, зеленый – CD3) Б – CD19-CAR T-клетки инкубировали с CD19⁺ EV и CD19-EV (красный - CD3, зеленый – CD63-GFP, синий – ядро (Hoechst33342)).

Влияние EV на функциональную активность CAR T-клеток

При распознавании CAR T-лимфоцитом опухолевой клетки, взаимодействие химерного антигенного рецептора с антигеном приводит к активации T-клетки и индукции секреции провоспалительных цитокинов (IFN γ , IL-2 и др.). Так как было показано, что опухолевые везикулы несут на своей поверхности опухолевый антиген и специфически взаимодействуют с CAR T-клеткой, была изучена способность EV к индукции

эффекторных функции CAR T-клеток. Методом ИФА $IFN\gamma$ и $IL-2$ были проанализированы супернатанты культур CD19-CAR T-клеток, проинкубированных с EV Nalm-6 CD19⁺ и Nalm-6 CD19⁻. Было обнаружено, что только экзосомы, содержащие CD19, вызывают продукцию провоспалительных цитокинов CD19-CAR T-клетками, что свидетельствует об их активации (Рис. 3,А).

Продукция цитокинов также может быть предпосылкой изменения цитотоксической активности CAR T-клеток, а именно способности убивать опухолевые клетки. Через 10 часов после начала эксперимента наблюдается заметное различие в цитотоксичности CD19-CAR клеток в отношении различных мишеней – образцы, обработанные CD19⁺ экзосомами, проявляют сниженную цитотоксическую активность (Рис. 3,В). Данный эффект может быть вызван связыванием CAR T-клетки с присутствующим на EV антигеном еще до встречи с клетками-мишенями. Однако, длительная инкубация CD19-CAR T-клеток с CD19⁺ экзосомами приводит к небольшому снижению цитотоксической активности CAR T-клеток по сравнению с контролем, что вероятно связано с поглощением EV CD19-CAR T-клеткой и появлением свободного CD19-CAR на поверхности (Рис. 3,Б).

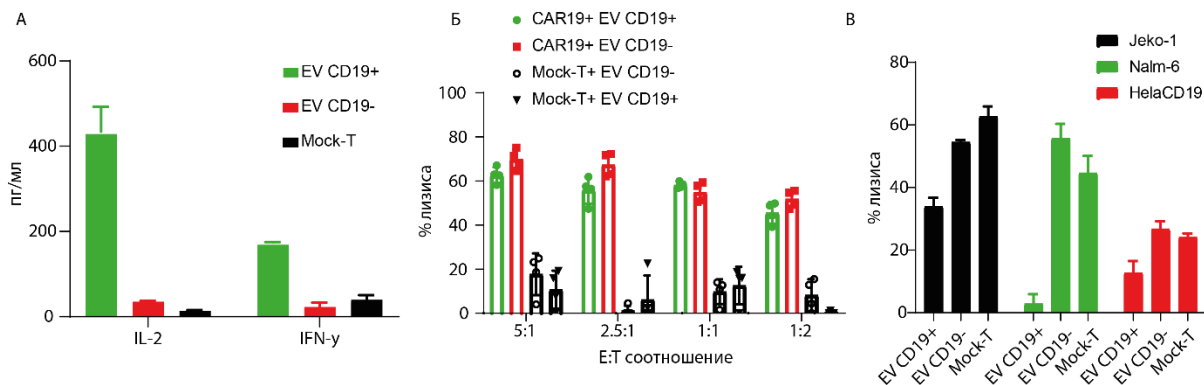
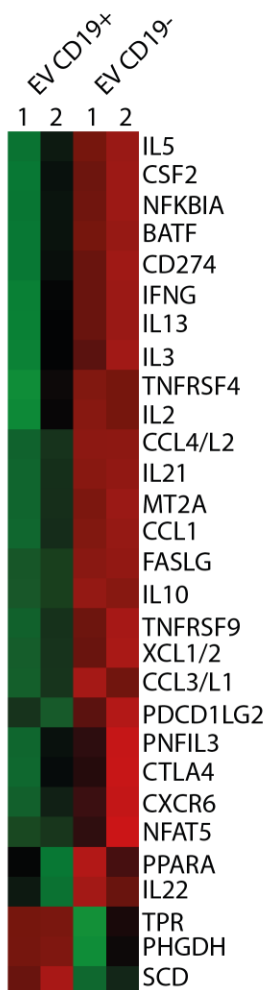


Рисунок 3. Анализ изменения функциональной активности CAR T-клеток под действием EV. А - Анализ секреции провоспалительных цитокинов при инкубации CD19-CAR T-клеток с CD19⁺ экзосомами (EV CD19⁺) или с CD19⁻ экзосомами (EV CD19⁻), (Mock-T) – анализ базового уровня провоспалительных цитокинов. Б - Анализ цитотоксичности CD19-CAR-T клеток (CAR19), которые были предварительно проинкубированы с EV CD19⁺ и EV CD19⁻. Не-трансдуцированные (Mock-T) клетки

использованы в качестве отрицательного контроля. В - Анализ цитотоксичности CD19-CAR-T клеток (как в Б), измеренный через 10 часов после начала эксперимента.

Эта преждевременная активация, возможно, приводит к проявлению эффекторных функций, что может влиять на пролиферацию и цитотоксичность CAR T-клеток. Для более детальной характеристики изменения эффекторной функции при поглощении EV клеткой, нами был проведен анализа транскриптома CAR T-клеток, обработанных EV. Основываясь на полученных данных, было установлено, что происходит глобальное увеличение экспрессии тех генов, которые ответственны за активацию T-клеток (Рис. 4). Примечательно то, что, кроме увеличения экспрессии генов, которые непосредственно свидетельствуют об активации CAR-T клетки (*IL-5*, *IL-2*, *CSF2*, *IL13*, *IFNG*, *IL21*, *IL10*,



NFAT5), также наблюдается увеличение транскриптов генов, которые ответственны за функциональное истощение и гибель активированных T-клеток, а именно гены белков апоптотических путей - *FASLG*, *TNFRSF4*, *TNFRSF9* и гены белков маркеров истощения – *CD274 (PDL-1)*, *CD273(PDL-2)*, *CTLA-4*.

Рисунок 4. Транскриптомный анализ CD19-CAR T-клеток, выделенных из двух доноров (1 и 2), проинкубированных с CD19+EV и CD19-EV. Данные представлены в виде тепловой карты и отображают изменение экспрессии mRNA, выделенной из CAR T-клеток. На тепловой карте представлены гены с $p < 0.05$.

Влияние искусственных антигенных везикул (AV) на противоопухолевую активность CAR-T клеток

Везикулы, секретлируемые опухолевыми клетками, несущие опухолевый антиген показали способность специфически взаимодействовать и активировать CAR T-клетки. Такие свойства неклеточных структур могут быть крайне востребованы в процессе получения и экспансии CAR T-клеток.

Так как выделение EV является крайне трудоемкой задачей, нами был разработан метод получения искусственных везикул (AV), основанный на обработке клеток цитохалазином В, который разрушает актиновый цитоскелет, что приводит к экструзии ядра, отслоению плазматической мембраны и отпочковыванию мембранных микроцитосфер. Эти микроцитосферы можно отделить от клеток встряхиванием суспензии клеток с образованием пузырьков, которые несут поверхностные белки, экспрессируемые «родительской» клеткой. Для создания AV, содержащих опухолевые антигены, была создана панель клеток HeLa, экспрессирующих опухолеассоциированные маркеры (CD33, CD123, CD19, IL13R2a, Her2). Размер и изображения, полученных AV, оценивали методами проточной цитофлуориметрии и трансмиссионной микроскопии. Обработка полученных на конфокальном микроскопе изображений AV с помощью программного пакета ImageJ позволила установить средний диаметр AV, который составил примерно 2400 нм.

Кроме того, в полученные стабильные клеточные линии в составе лентивирусных частиц вводили ген мембранно-заякоренного флуоресцентного белка dTomato, что обеспечивало флуоресцентное маркирование везикул.

Связывание CAR T-клеток с AV, несущими антигены и флуоресцентный белок dTomato-MTA

Чтобы продемонстрировать потенциал AV для детекции CAR T-клеток была создана панель генетических конструкций (CD19-CAR, IL13-CAR, HER2-CAR, CD33-CAR и CD123-CAR T-клеток), которая охватывает широкий спектр опухолевых заболеваний. Способность AV специфически связываться с соответствующими CAR T-клетками была исследована методом проточной цитофлуориметрии, где CAR T-клетки инкубировали с AV, содержащими флуоресцентный белок dTomato (Рис. 5). В качестве контроля использовались везикулы, не несущие опухолевых антигенов, для окрашивания использовались CAR T-клетки с различным процентом CAR-положительной популяции. Полученные результаты демонстрируют, что AV могут связывать и окрашивать клетки CAR-T с такой же эффективностью, что и mAb и рекомбинантные белки. Следовательно, AV могут стать альтернативным и доступным методом для детекции CAR, при отсутствии соответствующих коммерчески-доступных антител, как это было показано нами в случае CD33-CAR и CD123-CAR (Рис. 5).

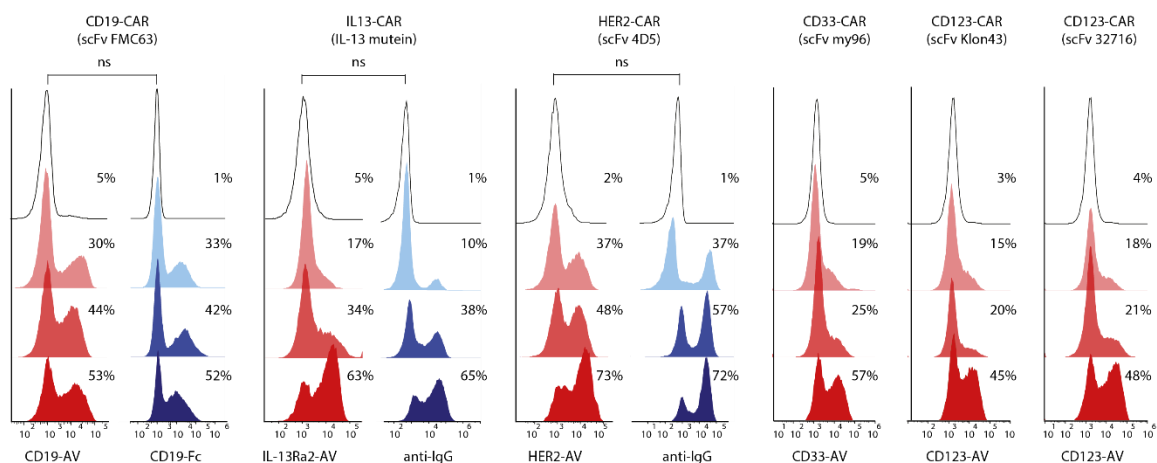


Рисунок 5. AV, экспрессирующие антигены CAR, связывают клетки CAR-T специфическим и дозозависимым образом и могут использоваться в качестве реагентов для обнаружения CAR. Параллельные окрашивания CAR-T искусственными везикулами и специфическими антителами (реагенты для обнаружения CAR). Данные представлены в виде гистограмм.

Для выяснения особенностей взаимодействия везикул с CAR T-клетками, была проведена сканирующая (Рис. 6,А) и конфокальная (Рис. 6,Б) микроскопии CD19-CAR-T или T-клеток (в качестве отрицательного контроля) после их инкубации с CD19-AV. В результате данных экспериментов можно утверждать, что CD19-AV остаются прикрепленными только к поверхности CD19-CAR T-клеток, а не к контрольным T-клеткам. На изображениях, полученных с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), видно, что везикулы круглой формы приклеиваются к поверхности клетки или располагаются на выступах мембраны (Рис. 6).

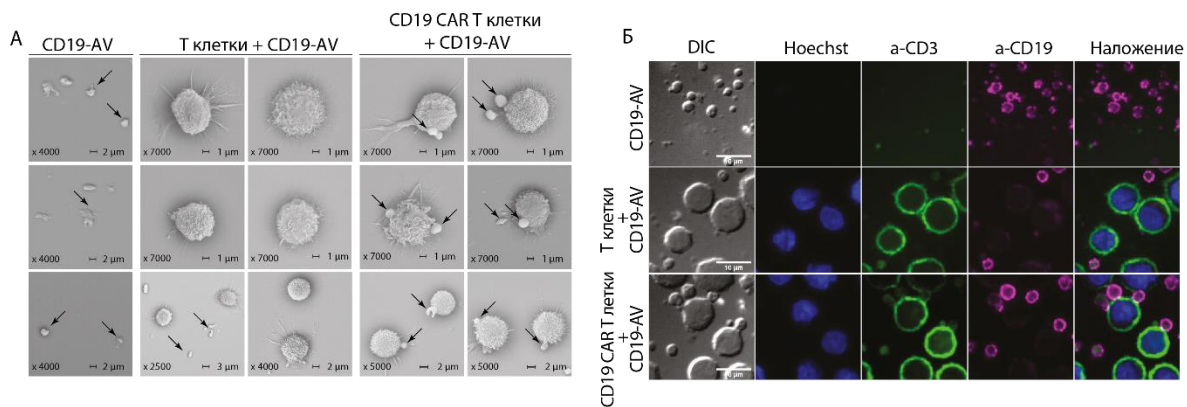


Рисунок 6. Сканирующая электронная микроскопия (Б) и конфокальные (А) изображения CAR T-клеток, связанных с AV.

Активация CAR T-клеток AV, несущими опухолеассоциированные антигены

Способность AV активировать CAR T-лимфоциты была протестирована в эксперименте ко-инкубации репортерной линии Jurkat-CAR-NFAT-fluc, модифицированной CAR, с различным количеством AV (положительных и негативных по антигену). Как и ожидалось, увеличение количества везикул, приходящееся на клетку Jurkat-CAR-NFAT-fluc приводило к значительному росту сигнала люминесценции. Примечательно, что контрольные везикулы, полученные из исходной клеточной линии, лишенной антигена, не активировали Jurkat-CAR-NFAT-fluc. Этот результат демонстрирует способность AV стимулировать CAR T-клетки (Рис. 7,А). Также было показано, что AV могут дозозависимо и антиген-специфично индуцировать секрецию провоспалительных цитокинов IFN γ и IL-2 CAR T-клетками (Рис. 7,В). При высоких соотношениях AV:CAR-T везикулы были сопоставимы или лучше для стимуляции и активации CAR T-клеток, чем соответствующие антиген-экспрессирующие клетки HeLa. Стоит отметить, что в обоих типах CAR T-клеток (CD19-CAR и IL13-CAR) продукция IL-2 была намного выше как при промежуточных, так и при высоких соотношениях AV:CAR-T, чем в случае ко-инкубации CAR T-клеток с фидерными антиген-содержащими клетками HeLa. Лучшую способность к активации можно объяснить доступностью AV для взаимодействия с CAR - общая поверхность цитоплазмы клетки HeLa должна быть намного больше, чем поверхность AV, но доступ к прикрепленным клеткам HeLa может быть затруднен для большого числа CAR T-клеток, в то время как AV свободно

плавают в растворе, следовательно, антиген на их поверхности более доступен для связывания с CAR T-клеткой.

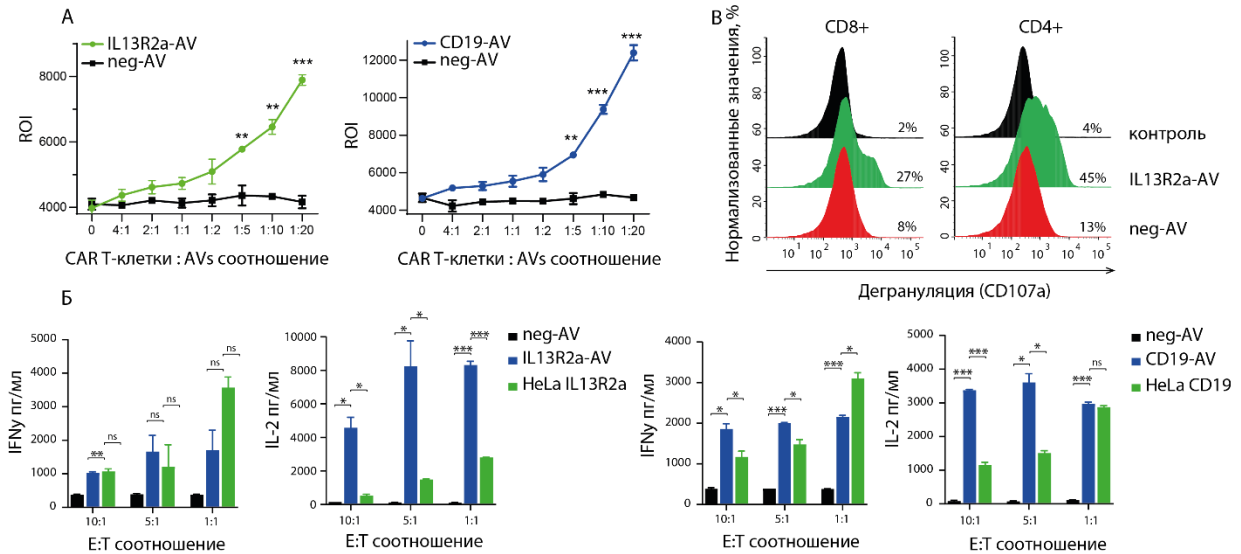


Рисунок 7. Инкубация с AV стимулирует CAR T-клетки. А - Анализ активации CAR-T Jurkat-NFAT-luc после культивирования с AV или контрольными антиген-отрицательными везикулами при различных соотношениях CAR T-клетки:AV. Б - Количественная оценка секреции IFN γ и IL-2 клетками IL13-CAR-T или CD19-CAR-T, культивированными при различном соотношении CAR-T: AV (E:T) с IL13R2a-AV или CD19-AV соответственно, или с не содержащими антиген контрольными везикулами (neg-AV). Параллельно Т-клетки CD19-CAR и IL13-CAR инкубировали при различных соотношениях CAR-T:клетки-мишени с антиген-экспрессирующими клетками HeLa-IL13R2a или HeLa-CD19, соответственно. В - Оценка дегрануляции IL13-CAR Т-клеток после культивирования в течение 4 часов с IL13R2a-AV или с контрольными AV. В качестве отрицательного контроля использовали CAR-T клетки, не подвергавшиеся действию активирующих стимулов. А-Б - Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение из трех экспериментальных повторности. Статистический анализ проводился с использованием дисперсионного анализа ANOVA.

Секреция провоспалительных цитокинов лимфоцитами также сопряжена с дегрануляцией - процессом выброса перфорина и гранзимов CAR T-клетками в ответ на

распознавание антигена. Данный процесс можно детектировать по появлению лизосомного маркера CD107a на поверхности Т-клеток. Нами было выяснено, что дегрануляция в CAR Т-клетках возникает только в случае добавления антиген-положительных AV (Рис. 7,В).

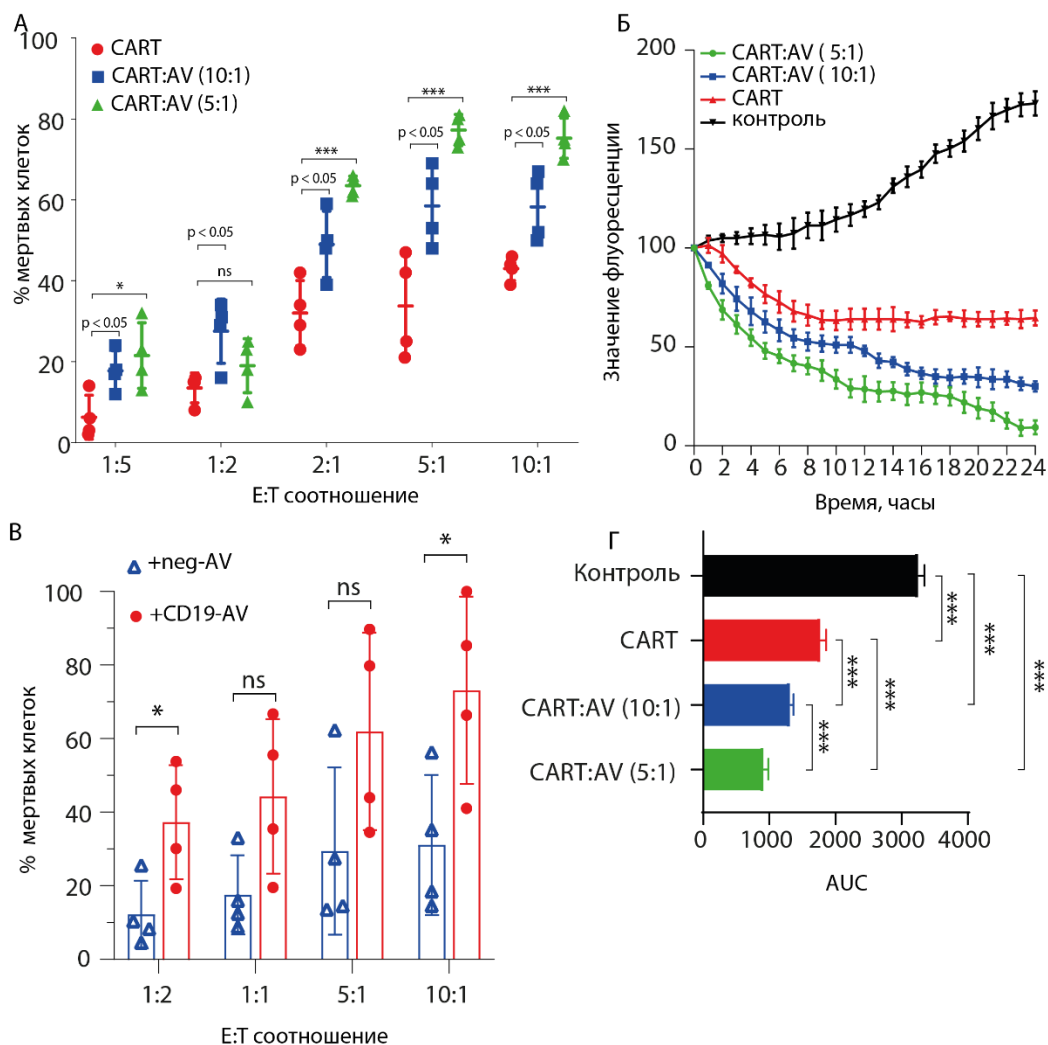


Рисунок 8. AV усиливают цитотоксические свойства CAR Т-клеток. А - *In vitro* активность контрольных CD19-CAR Т-клеток и культивированных с CD19-AV при соотношении CAR-T: AV 10: 1 или 5: 1. На 4 день после начала обработки везикулами CAR Т-клетки инкубировали с клетками-мишенями Jeko-1 при различных соотношениях эффекторных клеток и клеток-мишеней. Б - IncuCyte анализ элиминации Jeko-1 CD19-CAR Т клетками, необработанными или обработанными CD19-AV при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней 3: 1. В - А - *In vitro* активность CD19-CAR-T,

полученных из клеток больных ОЛЛ, которые были культивированы с CD19-AV при соотношении CAR-T:AV 5:1. CAR-T анализировали на уровень цитотоксической активности против клеток Jeko-1. Г – Репрезентативное представление полученных данных Incisute по рассчитанной площади под кривой (AUC). А-Г - Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение из четырех экспериментальных повторов и представляют не менее двух независимых экспериментов. Статистический анализ проводили, используя дисперсионный анализ ANOVA.

Далее было изучено влияние искусственных везикул на функциональную активность CAR T-клеток. Полученные данные свидетельствуют, что даже при низком соотношении CAR-T:AV (10:1) способность CD19-CAR T-клеток убивать клетки-мишени значительно увеличивается при стимуляции CD19-AV (Рис. 8,А). Этот феномен наблюдали и в случае CAR T-клеток, полученных от здоровых доноров, и CAR T-клеток, полученных из клеток больных ОЛЛ (Рис. 8,Б,В,Г). Также стимуляция CD19-CAR T-клеток CD19-AV позволяет клеткам сохранять свою цитотоксичность и пролиферативный потенциал в течение 21 дня инкубации с клетками-мишенями. Следовательно AV способны не только активировать CAR T-клетки, но и поддерживать их пролиферацию и цитотоксичность дольше, чем в стандартных условиях стимуляции с помощью рекомбинантных цитокинов или фидерных клеток (Рис 9).

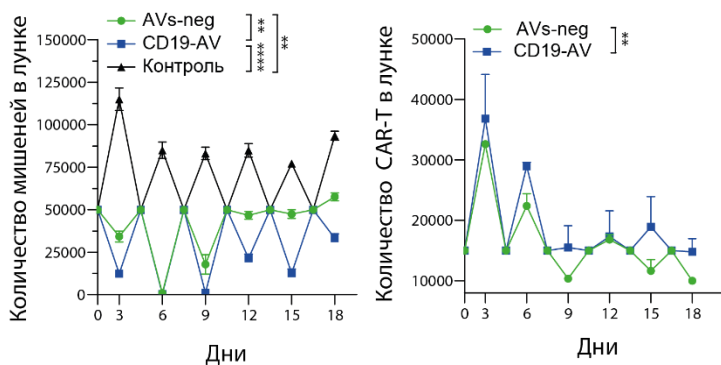


Рис 9. «Sequential killing» клеток-мишеней Jeko-1 CD19-CAR клетками, обработанными CD19-AV или контрольными везикулами. Количество клеток-мишеней и CAR T-клеток анализировали каждые 3 дня путем

иммуноокрашивания с последующей проточной цитометрией. Оставшиеся CAR T-клетки смешивали со свежими клетками-мишенями в прежнем соотношении и инкубировали еще 3 дня. Процедуру повторяли семь раз в течение 21 дня. Данные представлены в виде

среднего значения \pm стандартное отклонение из четырех экспериментальных повторов и представляют данные двух независимых экспериментов.

Изучение влияния AV на пролиферацию и дифференцировку CAR T-клеток

Так как была показана способность AV активировать CAR T-клетки, логично было предположить, что их можно использовать для антиген-специфической экспансии CAR T-клеток в культуре в процессе их приготовления. Чтобы проверить эту гипотезу, CD19-положительные (CD19-AV) и контрольные AV добавляли к клеткам CD19-CAR. Мембрана CD19-CAR T-клеток была мечена CFSE, что позволило наблюдать за пролиферативной активностью клеток (уровень свечения меченных клеток пропорционален числу делений). Как и ожидалось, в образце CAR T-клеток, инкубированных с контрольными AV, отсутствовал прирост числа клеток, в то время как скорость пролиферации и увеличение числа CAR T-клеток в присутствии CD19-AV была сопоставима со скоростью, наблюдаемой при стимуляции IL-2 (Рис. 10,А). Так как стимуляция AV является антиген-специфичной, только CAR-положительные клетки активно пролиферируют, что подтвердила инкубация клеток IL13-CAR с IL13R2a-положительными (IL13R2a-AV) или IL13R2a-негативными контрольными AV. В образцах, стимулированных контрольными AV, доля CAR-положительной фракции почти не менялась, а в образцах, стимулированных IL13R2a-AV, доля CAR T-клеток резко увеличилась с 22% в день 1 до 55% в день 7 (Рис. 10,Б).

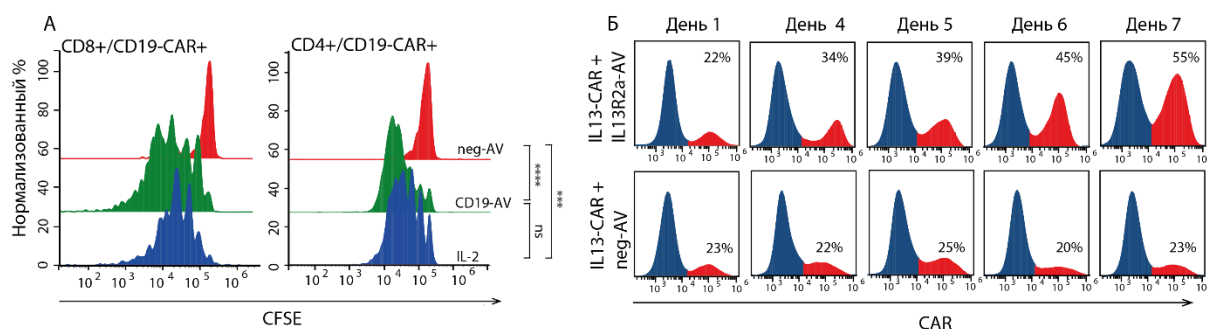


Рисунок 10. Антиген-специфическая экспансия CAR-T-клеток. А - Анализ CD19-CAR T-клеток, меченных CFSE. Клетки культивировали в присутствии IL-2, CD19-AV или контрольных AV в соотношении 5:1 в течение 4 дней. Уменьшение сигнала CFSE оценивали с помощью проточной цитометрии. Данные представлены как среднее \pm стандартное

отклонение из трех экспериментальных повторов и представляют не менее двух независимых экспериментов. Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Б - Увеличение процентного содержания IL13-CAR T-клеток, которые культивировали в присутствии антиген-положительных (IL13R2a-AV) или не содержащих антиген контрольных AV в соотношении 5:1 в течение 7 дней. Значения на графиках показывают долю CAR T-клеток в суспензии.

Известно, что процесс активной пролиферации в условиях хронической стимуляции T-клеток неминуемо ведет к их истощению и смерти. Использование AV в процессе создания CAR T-клеток также может привносить дополнительные риски ранней гибели T-клеток. Для изучения возможного негативного эффекта был проведен анализ маркеров истощения и дифференцировки T-клеток у CD19-CAR T-клеток, активированных различными стимулирующими агентами, в том числе CD19-AV.

Анализ клеток, инкубированных с различными активирующими агентами (Dynabeads/IL-2, IL-2, CD19-AV и HeLa CD19) показал, что на 7 и 14 день скорость пролиферации CAR T-клеток, стимулированных AV, была в пять раз выше в сравнении с клетками, в присутствии Dynabeads/IL-2 или HeLa CD19 (Рис. 11,А). Существенное увеличение CAR-положительной популяции наблюдалось только при стимуляции CD19-AV, причем как для CD4⁺, так и для CD8⁺ T-клеток (с 23% до 31% для CD4⁺ T-клеток и с 13% до 22% для CD8⁺) (Рис. 11,Б,В). Анализ фенотипа CAR T-клеток спустя 7 и 14 дней культивации в случае стимуляции CD19-AV показал сохранение T-клеток в состоянии T_{naive} (популяция наивных T-клеток) и T_{cm} (популяция T-клеток центральной памяти), в то время как стимуляция Dynabeads/IL-2 или фидерными клетками приводила к преобладанию популяций T_{em} (популяция T-клеток эффекторной памяти) и T_{emra} (популяция терминально-дифференцированных T-клеток) (Рис. 12). Проанализировав количество T-клеток, экспрессирующих маркеры истощения PD-1 и TIGIT, мы установили, что на 14-й день для CAR T-клеток, стимулированных CD19-AV, процент TIGIT⁺ клеток был самым низким по сравнению с другими группами (Рис. 11,Г).

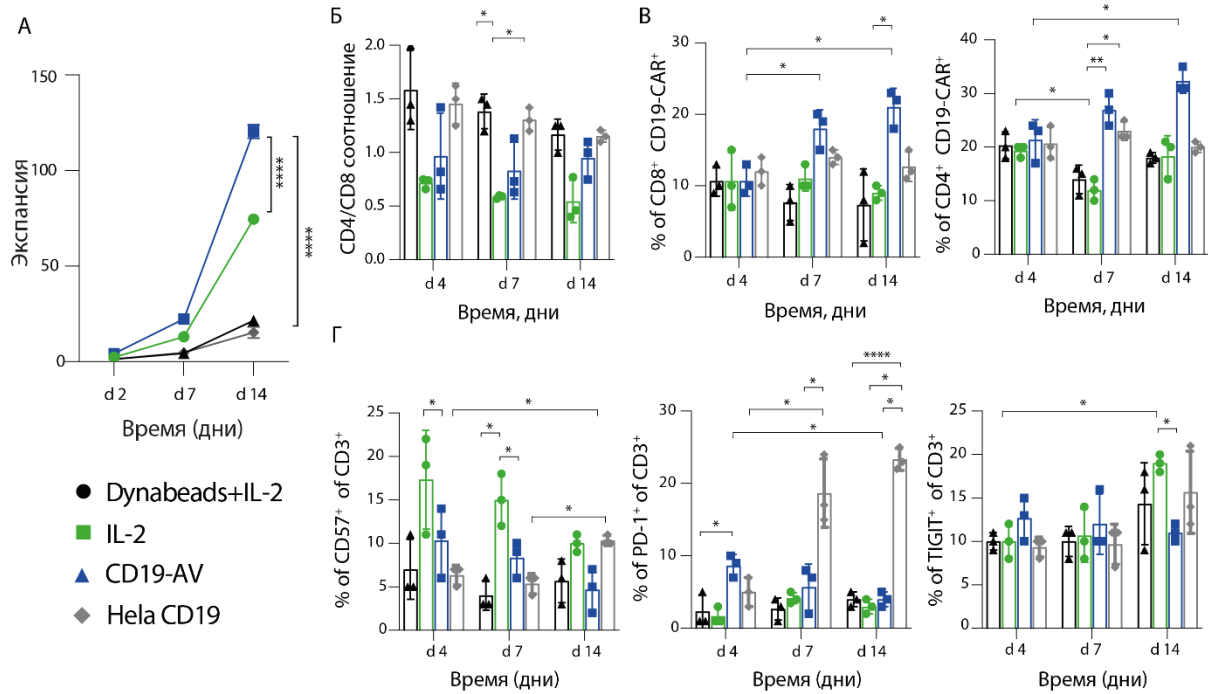
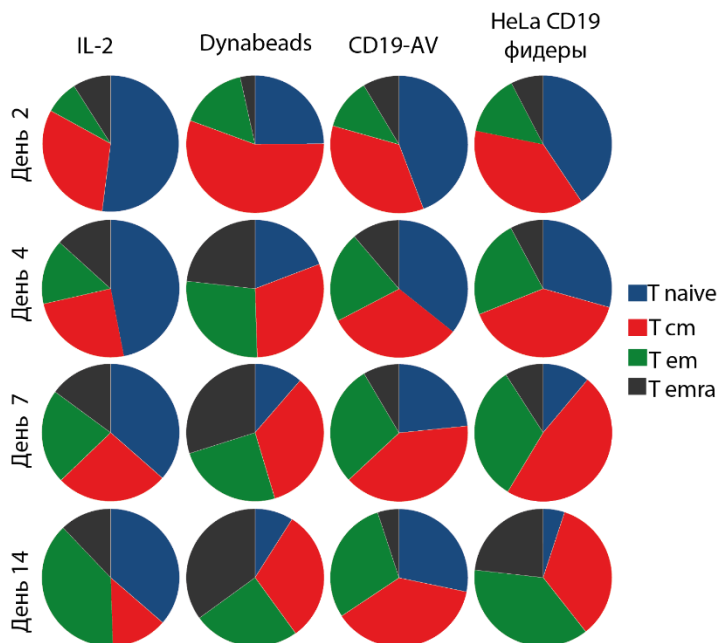


Рисунок 11. Анализ популяционных и фенотипических изменений CD19-CAR T-клеток, вызванных стимуляцией CD19-AV. А – Анализ экспансии CAR T-клеток, подвергшихся воздействию различных стимулов активации. Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Б - Оценка изменений соотношения CD4/CD8 в популяции клеток CD19-CAR-T, подвергшихся воздействию различных стимулов активации (фидеров, Dynabeads / IL-2, IL-2 или HeLa CD19). В - Анализ CD19-CAR-положительных клеток в субпопуляциях CD4 и CD8, измеренных с помощью проточной цитометрии на 4, 7 и 14 дни. Г - Анализ фракций клеток CD19-CAR, экспрессирующих маркеры истощения PD-1, CD57 и TIGIT среди CD3⁺ клеток, подвергшиеся воздействию тех же стимулов, что и в Б. А-Г Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение из трех экспериментальных повторов и представляют не менее двух независимых экспериментов. Статистический анализ проводили, используя дисперсионный анализ ANOVA.

В то же время стимуляция IL-2 постепенно увеличивала долю TIGIT⁺. Стоит также отметить, что процент PD-1⁺ T-клеток резко возрастал в образцах с фидерными клетками

HeLa CD19. Совместная инкубация CAR T-клеток с IL-2 приводила к более сильной нежелательной активации CAR T-клеток по сравнению с CD19-AV и другими группами,



что было заметно по увеличению уровня маркера CD57 (Рис. 11,Г).

Рисунок 12. Количественная оценка изменения состояния дифференцировки клеток CD19-CAR в ответ на различные стимулирующие агенты: CD3/CD28 Dynabeads/IL-2, IL-2, CD19-AV или фидерные клетки HeLa CD19. Данные представлены как среднее значение трех независимых экспериментов.

Стимуляция AV положительно влияет на персистенцию и противоопухолевую активность CAR-T в ксенотрансплантационной мышинной модели лимфомы (B-ALL)

Чтобы изучить функциональную активность *in vivo* CD19-CAR T-клеток, полученных с помощью стимуляции CD19-AV, был осуществлен эксперимент на мышах NSG с привитой лейкозной линией клеток человека Nalm-6 (Рис. 13). Для прижизненной визуализации роста опухоли и терапевтического эффекта CAR-T были созданы стабильные репортерные линии клеток Nalm-6, несущие ген люциферазы *ffluc* под контролем конститутивного промотора. На 6 день после введения мышам Nalm-6-*ffluc* клеток мышей случайным образом разделили на 3 группы: Mock-T (контрольные T-клетки); CD19-CAR (CAR клетки, полученные классическим способом с IL-2); CD19-CAR&AVs (CD19-CAR T клетки, обработанные CD19-AV). Через 14 дней в группах CD19-CAR и CD19-CAR&AVs наблюдалось полное подавление роста опухолевых клеток, что резко контрастировало с контрольной группой (Рис. 13,Б).

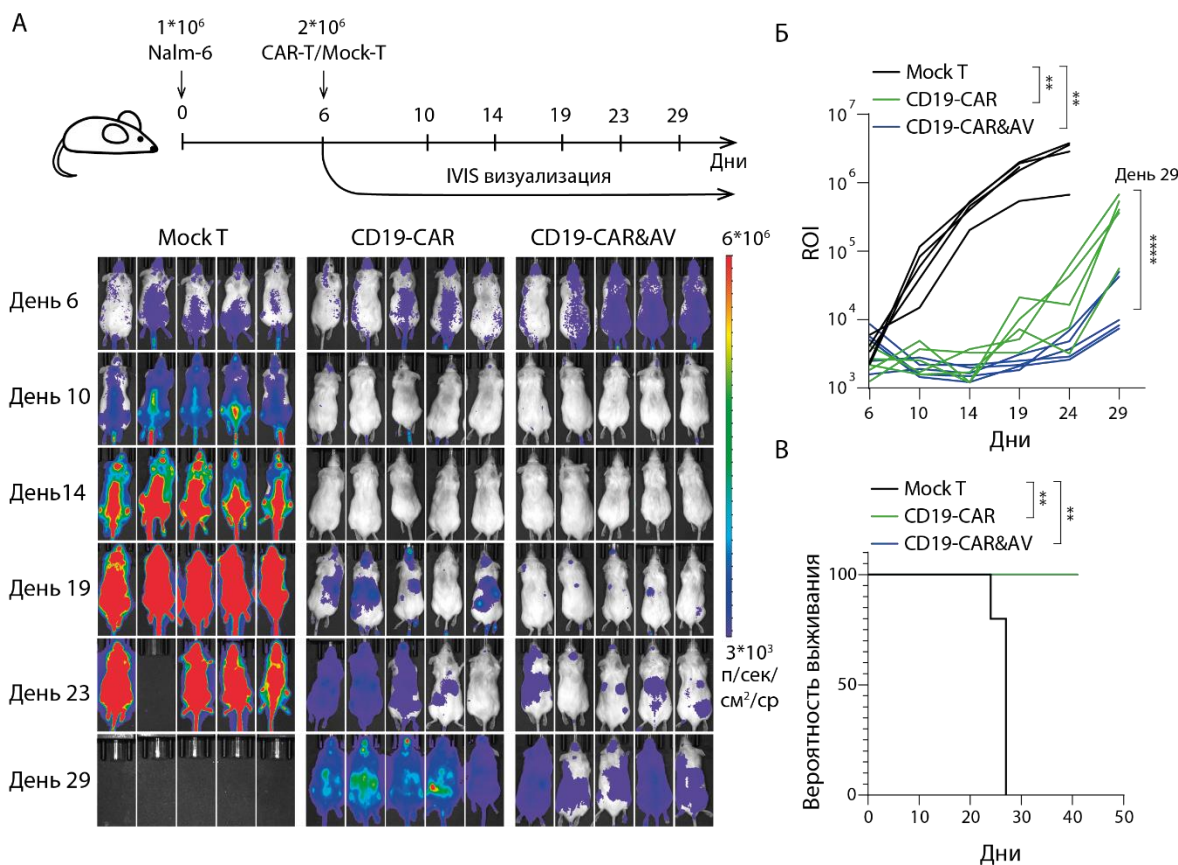


Рисунок 13. Билюминесцентная визуализация NSG мышей, которым ввели клетки лимфомы человека Nalm-6, синтезирующие люциферазу, а затем CD19-CAR T-клетки, предварительно стимулированные CD19-AV или IL-2. А - Мышам с развившейся опухолью на 6 день вводили равное количество контрольных Т-клеток (Mock-T) человека или CD19-CAR Т-клеток, которые размножили в присутствии либо IL-2, либо CD19-AV; Б - Опухолевая нагрузка по данным билюминесцентной визуализации, измеренная с течением времени; Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента. В - Кривая выживаемости Каплана – Мейера. Статистическая значимость рассчитывали с использованием логарифмического рангового критерия Мантеля – Кокса. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение (n=5).

Однако, на 19-й день у мышей из группы CD19-CAR, начался рецидив опухоли, в то время как в группе CAR-T, стимулированными CD19-AV, сохранялась продолжительная ремиссия. Животные в группах, получавших CD19-CAR, показали равную выживаемость

по сравнению с группой, получавшей контрольные Mock-T (Рис. 13,В). Суммируя, можно сказать, что антигенные искусственные везикулы AV позволяют повысить эффективность CAR-T терапии *in vivo*.

AAV-опосредованный перенос гена ДНКазой I в печень снижает рост метастазов колоректального рака в печени

кДНК ДНКазы I человека, встроенную в плазмидный вектор на основе аденоассоциированного вируса AAV под контролем специфического для печени промотора, использовали для эктопической секреции этого фермента клетками гепатомы. Вирус AAV-ДНКазы I эффективно трансдуцировал клетки HepG2, что приводило к значительному увеличению активности ДНКазы I в супернатантах вплоть до 72 часов после трансдукции.

Чтобы определить, может ли инъекция AAV-ДНКазы I ингибировать прогрессирование метастазов колоректального рака (colorectal cancer, CRC) в печень, мышам через воротную вену вводили клеточную линию рака толстой кишки MC38. Через четыре дня после инъекции клеток MC38 мышам однократно инъецировали $1,05 \times 10^{12}$ копий генов AAV-ДНКазы I или AAV-null (в качестве отрицательного контроля) на мышь и наблюдали за ростом опухоли в течение 21 дня (Рис. 14,А).

Биолюминесцентная визуализация опухоли показала, что развитие метастазов у мышам, обработанных AAV-ДНКазы I, было снижено по сравнению с мышами в группе, которым вводили AAV-null (Рис. 14,Б). Развитие плотных метастазов, вероятно, было снижено в результате ферментативной активности ДНКазы I, расщепляющей нити ДНК, содержащиеся в составе NET. Также было показано, что однократное введение AAV-ДНКазы I ингибировало прогрессирование метастазов в печень (у самцов и самок) по сравнению с мышами, получавшими AAV-null (Рис. 14,Д, Е). Введение AAV-ДНКазы I также значительно уменьшало количество метастатических узелков (Рис. 14,В, Г). Эти результаты дополнительно подтверждают, что обработка AAV-ДНКазы I ингибирует прогрессирование метастазов в печени в модели CRC.

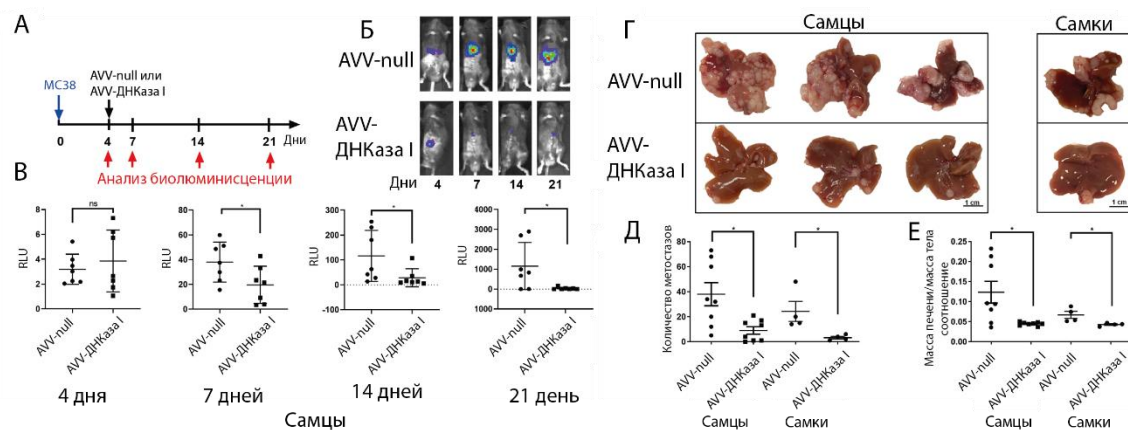


Рисунок 14. Анализ активности ДНКазы I *in vivo* на мышинной модели колоректального рака (перевиваемая клеточная линия MC38). А – характеристика эксперимента на мышах с временными точками. Б - Мышам с развившейся опухолью на 4 день вводили равное количество AAV-ДНКазы I либо AAV-null. В– Опухолевая нагрузка по данным биоломинесцентной визуализации, измеренная с течением времени в двух группах, пролеченных либо AAV-ДНКазы I либо AAV-null. Г – Изображения, характеризующие количество метастазов на 21 день после введения опухоли в группах мышей, пролеченных либо AAV-ДНКазы I, либо AAV-null. Д- Зависимость количества метастазов от пола мыши, измеренная с течением времени в двух группах, пролеченных либо AAV-ДНКазы I, либо AAV-null. Е - Зависимость отношения веса печени к весу тела от пола мыши, измеренная с течением времени в двух группах, пролеченных либо AAV-ДНКазы I либо AAV-null.

AAV-опосредованный перенос гена ДНКазы I в печени позволяет активировать иммунный ответ в микроокружении опухоли

Полученные результаты демонстрируют, что AAV-опосредованный перенос гена ДНКазы I в клетки печени может усилить врожденный иммунный ответ против опухоли. Однако, адаптивные иммунные клетки в ТМЕ играют не менее важную роль в борьбе с опухолью. Для анализа присутствия иммунных клеток в ТМЕ было проанализировано количество CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в метастатической ткани с помощью иммуногистохимии (Рис. 15). По сравнению с группой, обработанной AAV-null, процент CD8⁺ Т-клеток в участке опухоли был значительно увеличен в группе AAV-ДНКазы I (Рис. 15,А). Следовательно, введение ДНКазы I позволяет облегчить проникновение CD8⁺ Т-клеток в опухоль. Однако, процент CD4⁺ Т-клеток в области метастазов у мышей, обработанных

AAV-ДНКза I, существенно не отличался от такового в группе, обработанной контрольным AAV-null (Рис. 15,Г).

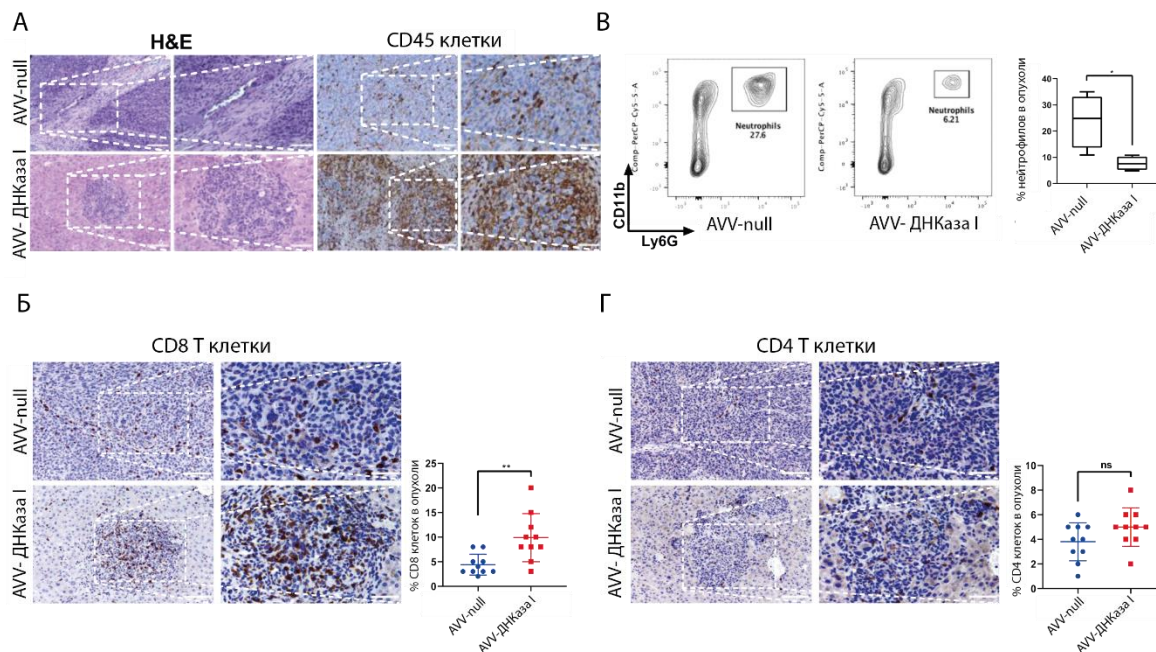


Рисунок 15. Анализ иммунных клеток в опухолях мышей, пролеченных либо AAV-ДНКза I, либо AAV-null. А – Иммуногистохимия опухолей, окрашенных на CD45 Б - Иммуногистохимия опухолей, окрашенных на CD8 В – Цитофлуориметрический анализ клеток, выделенных из опухолевого микроокружения, на присутствие опухолеассоциированных нейтрофилов. Г - Иммуногистохимия опухолей, окрашенных на CD4.

Аналогичные результаты по различающемуся процентному содержанию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в опухолевых тканях также были подтверждены методом проточной цитометрии. Доля CD8⁺ Т-клеток была значительно выше у мышей, обработанных AAV-ДНКза I, по сравнению с мышами, обработанными AAV-null. В то время как, хоть и незначительно, доля CD4⁺ Т-клеток имела тенденцию к повышению у мышей, получавших AAV-ДНКза I. Также, методом проточной цитометрии, было обнаружено, что ДНКза I позволяет снизить количество опухолеассоциированных нейтрофилов в опухолевом микроокружении (Рис. 15,В). Эти результаты свидетельствуют о том, что AAV опосредованный перенос гена ДНКазы I индуцировал противоопухолевый иммунный ответ посредством модуляции как врожденных, так и адаптивных механизмов иммунитета.

ВЫВОДЫ

1. Впервые подробно охарактеризовано взаимодействие опухолевых экзосом, выделенных из клеток лимфом и глиом, с CAR T-клетками и показано, что их влияние на активность CAR-T зависит от присутствия опухолевого антигена на поверхности экзосом.
2. Показано, что опухолевые экзосомы, выделенные из клеток лимфом и глиом могут как активировать, так и подавлять, функцию CAR T-клеток, влияя на цитотоксичность, секрецию воспалительных цитокинов, а также изменять профиль экспрессии генов CAR T-клеток.
3. Впервые разработан способ получения искусственных антигенных везикул, несущих опухолевый антиген для детекции химерного антигенного рецептора на поверхности T клеток. Доказано, что эти везикулы можно с успехом применить для идентификации и выделения CAR-положительной популяции T-клеток.
4. Искусственные везикулы, специфично активируя CAR T-клетки, позволяют получить CAR T-клеточный продукт с повышенной функциональной активностью *in vitro* и *in vivo*.
5. Использование ДНКазы I при терапии колоректального рака не только позволяет эффективно бороться с внеклеточными ловушками нейтрофилов, но и может восстановить иммунный ответ в микроокружении опухоли, обеспечив иммунный контроль над раковыми клетками, что приводит к ингибированию развития метастазов CRC в печени.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

Ukrainskaya, V. M., Rubtsov, Y. P., Pershin, D. S., Podoplelova, N. A., Terekhov, S. S., Yaroshevich, I. A., Sokolova, A. I., Bagrov, D. V., Kulakovskaya, E. A., Shipunova, V., Deyev, S. M., Ziganshin, R. H., Chernov, A. S., Telegin, G. B., Maksimov, E. G., Markov, O. V., Oshchepkova, A. L., Zenkova, M. A., Xie, J., Zhang, H., Gabibov, A. G., Maschan, M. M., Stepanov, A. V., Lerner, R. A., Antigen-Specific Stimulation and Expansion of CAR-T Cells Using Membrane Vesicles as Target Cell Surrogates. *Small* 2021, 2102643. <https://doi.org/10.1002/smll.202102643>

V. M. Ukrainskaya, Y. P. Rubtsov, V. D. Knorre, M. A. Maschan, A. G. Gabibov, and A. V. Stepanov «The Role of Tumor-Derived Vesicles in the Regulation of Antitumor Immunity» December 2019 *Acta Naturae* 11(4):33-4 doi: 10.32607/20758251-2019-11-4-33-41

Xia, Y., He, J., Zhang, H., Wang, H., Tetz, G., Maguire, C.A., Wang, Y., Onuma, A., Genkin, D., Tetz, V., Stepanov, A., Terekhov, S., **Ukrainskaya, V.**, Huang, H. and Tsung, A. (2020), AAV-mediated gene transfer of DNase I in the liver of mice with colorectal cancer reduces liver metastasis and restores local innate and adaptive immune response. *Mol. Oncol.*, 14: 2920-2935. doi: 10.1002/1878-0261.12787

Ukrainskaya V.M., Stepanov A.V., Glagoleva I.S., и др. Death Receptors: New Opportunities in Cancer Therapy // *Acta Naturae*. - 2017. - Т. 9. - №3. - С. 55-63. doi: 10.32607/20758251-2017-9-3-55-63

Ukrainskaya VM, Stepanov AV, Belogurov AA Jr, Gabibov AG "Combinatorial Screening of Peptides, Specific Ligands of Death Receptor DR5." *Bull Exp Biol Med*. 2017 Jul;163(3):381 doi: 10.1007/s10517-017-3809-8

Ukrainskaya VM, Bobik TV, Argentova-Stevens A, Slutsкая EA, Kalinin RS, Gabibov AG, Stepanov AV. "Directed Change in TNF α Specificity to Create DR5 Antagonists." *Bull Exp Biol Med*. pages 386–389 (2018) Jul 12. doi: 10.1007/s10517-018-4176-9

Опубликованные тезисы и доклады:

Украинская В.М., Рубцов Ю.П., Габибов А.Г., Масчан М.А., Степанов А.В. 1 «Изучение влияния искусственных антиген-презентирующих везикул на противоопухолевую активность CAR-T клеток» XXXIII Зимняя молодежная научная школа, 2021, Москва

V. Ukrainskaya «Antigen specific stimulation and expansion of CAR-T cells using membrane vesicles as target cell surrogates» (2021), Posters. *FEBS Open Bio*, 11: 103-507. doi:10.1002/2211-5463.13205

Патенты:

Степанов А.В. **Украинская В.М.**, Белогуров А. А., Габибов А.Г., Патент № 2 720912 «Способ получения модельной иммортализованной линии клеток, содержащей реконструированный В-клеточный рецептор неходжкинских лимфом человека»