

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Украинская Валерия Михайловна

*Изучение влияния опухолевого микроокружения на противоопухолевую активность CAR
Т-клеток*

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

по специальности «1.5.3. Молекулярная биология»

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук

Степанов Алексей Вячеславович

Москва 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	1
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	7
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	9
1.1. CAR T-лимфоциты и опухолевое микроокружение	9
1.2. Развитие технологии CAR-T	10
1.3. Активация химерного антигенного рецептора	14
1.4. Подходы к экспансии и пролиферации CAR T-клеток	17
1.5. Опухолевое микроокружение	21
1.6. Характеристика экзосом как части опухолевого микроокружения	24
1.7. Биогенез везикул и взаимодействие с таргетными клетками	27
1.8. Иммунный ответ и роль опухолевых экзосом	30
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	37
2.1. Химические реактивы и сопутствующие материалы.	37
2.2. Работа с нуклеиновыми кислотами	40
2.2.1. Амплификация ДНК методом ПЦР	40
2.2.2. Рестрикция	41
2.2.3. Лигирование	41
2.2.4. Трансформация клеток E.coli методом теплового шока	41
2.2.5. Выделение плазмидной ДНК	41
2.2.6. Электрофорез ДНК в агарозном геле	42
2.2.7. Получение последовательностей генов из эукариотических клеток	42
2.3. Работа с белками	42
2.3.1. Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле	42
2.3.2. Вестерн блот	43
2.4. Работа с культурами эукариотических клеток	44
2.4.1. Поддержание в культуре адгезионных эукариотических клеток	44
2.4.2. Поддержание в культуре суспензионных эукариотических клеток	44
2.4.3. Трансфекция для создания лентивирусных частиц	44
2.4.4. Создание аденоассоциированных вирусных частиц	45
2.4.5. Определение титра лентивирусных частиц	46
2.4.6. Выделение Т клеток	46
2.4.7. Трансдукция эукариотических клеток лентивирусными конструкциями	46
2.4.8. Получение линии Nalm-6, нокаутированной по CD19	47
2.5. Получение и характеристика экзосом и везикул	48
2.5.1. Выделение экзосом методом ультрацентрифугирования	48
2.5.2. Выделение экзосом методом осаждения ПЭГом	48
2.5.3. Получение искусственных антигенных везикул	48
2.5.4. NTA анализ	49
2.5.5. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)	49
2.5.6. Детекция хемилюминесценции CD63-nanoluc экзосом	49
2.5.7. Конфокальная микроскопия	50

2.5.8. Сканирующая электронная микроскопия	50
2.5.9. Анализ искусственных везикул методом жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии	51
2.6. Функциональные эксперименты	52
2.6.1. Проточная цитофлуориметрия	52
2.6.2. Инкубация CAR T-клеток в присутствии экзосом (EV)	53
2.6.3. Анализ эффекторной активности CAR T-клеток	53
2.6.4. Детекция секреции провоспалительных цитокинов методом ELISA	55
2.6.5. Люциферазный эксперимент на клетках Jurkat-NFAT-luc	56
2.6.6. Анализ уровня дегрануляции T-клеток	56
2.6.7. Выделение мРНК и Nanostring анализ	57
2.6.8. Изучение пролиферативной активности CAR T-клеток	57
2.6.9. Анализ истощения и дифференциации CAR T-клеток под действием AV	58
2.6.10. Анализ концентрации ДНКазы I	58
2.7. Работа с животными	59
2.7.1. Получение опухолевых клеток, экспрессирующих ген люциферазы	59
2.7.2. Работа с мышами NSG	59
2.7.3. Работа с мышами линии C57BL/6	60
2.7.4. Иммуногистохимия	60
2.7.5. Статистический анализ	61
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	62
3.1. Введение (влияние факторов микроокружения на CAR T-клетки и эффективность CAR-T терапии)	62
3.2. Изучение влияния экзосом EV на противоопухолевую активность CAR T-клеток	63
3.2.1. Получение клеточной линии Nalm-6, нокаутированной по CD19 антигену	63
3.2.2. Получение репортерных линий клеток, продуцирующих маркированные рекомбинантными белками EV, и выделение меченых везикул из культуральных супернатантов	65
3.2.3. Создание T клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами.	69
3.2.4. Связывание опухолевых EV с CAR T-клетками.	71
3.2.5. Влияние EV на функциональную активность CAR T-клеток	74
3.3. Влияние искусственных антигенных везикул (AV) на противоопухолевую активность CAR T-клеток	76
3.3.1. Получение и характеристика искусственных антигенных везикул (AV)	77
3.3.2. Искусственные везикулы могут быть использованы как новый класс агентов для окрашивания CAR T-клеток.	82
3.3.3. Активация CAR T-клеток AV, несущими опухоль-ассоциированные антигены.	84
3.3.4. Изучение влияния AV на пролиферацию и дифференцировку CAR T-клеток.	90
3.3.5. Стимуляция AV позитивно влияет на персистенцию и противоопухолевую активность CAR T-клеток в ксенотрансплантационной мышинной модели лимфомы (B-ALL)	94
3.4. Изучение влияния ДНКазы для уменьшения негативных эффектов опухолевого микроокружения	98

3.4.1. Трансдукция AAV, содержащим кДНК ДНКазы I, культивируемых клеток гепатомы человека приводит к секреции ДНКазы I.	99
3.4.2. AAV-опосредованный перенос гена ДНКазой I в печень снижает рост метастазов колоректального рака в печени	100
3.4.3. AAV-опосредованный перенос гена ДНКазы I в печени позволяет активировать иммунный ответ в микроокружении опухоли	101
4. ВЫВОДЫ	103
5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	104
5. ПРИЛОЖЕНИЕ	116
<i>5.1. Приложение 1. Таблица 3. Антитела, использованные в работе</i>	116
<i>5.2. Приложение 2. Таблица 4. Получение генетических конструкций и использованные праймеры и рестриктазы.</i>	117

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

TCR – T-клеточный рецептор;
TIL – лимфоциты, инфильтрирующие опухоль;
CD – кластер дифференцировки;
GVL – реакция трансплантат против лейкемии;
GVHD - болезнь трансплантат против хозяина;
IL – интерлейкин;
CAR-T - T-клетки, модифицированные химерным антигенным рецептором;
scFv - вариабельные фрагменты одноцепочечных антител;
ХЛЛ - хроническим лимфолейкоз;
ОЛЛ - острый лимфобластный лейкоз;
CRISPR - кластерные регулярно размещенные короткие палиндромные повторы;
TNF - факторы некроза опухоли;
EV – внеклеточные везикулы;
AV – антигенные везикулы;
Hsp – белки-шапероны;
cSMAC - центральный супрамолекулярный активационный кластер;
MHC – основной комплекс гистосовместимости;
АПК – антигенпрезентирующие клетки;
T_{rsm} - T-клетки с резидентной памятью;
T_{em} - T-клетки эффекторной памяти;
T_{cm} - T-клетки центральной памяти;
Th1 – T-хелпер 1 типа;
Th2 – T-хелпер 2 типа;
T_{emra} - терминально дифференцированные T-клетки;
PVMC – мононуклеарные клетки периферической крови
mAb – моноклональные антитела;
aAPC – искусственные антиген-презентирующие клетки;
TME – опухолевое микроокружение;
NET - внеклеточные ловушки нейтрофилов
N-SMase – нейтральная сфингомиелиназа;

ARF6 – фактор ADP-рибозилирования 6;
ESCRT – эндосомальный комплекс сортировки;
MVBs – мультивезикулярные тельца;
PLD2 – фосфолипаза D2;
Treg – регуляторная Т-клетка;
NK – натуральный киллер;
Bid, Bad, Bcl-2, Bax – белки семейства Bcl2;
DED – эффекторные домены;
DISC - индуцирующий смерть сигнальный комплекс
FADD – Fas - белок, ассоциированный с доменом смерти;
IAP, c-FLIP – белки, ингибиторы апоптоза;
NF- κ B - транскрипционный ядерный фактор каппа-цепи активированных В-клеток;
TNFRSF - агонист суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли;
TRADD – белок, ассоциированный с доменом смерти;
C-FLIP - белок, ингибирующий FLICE;
TRAIL – лиганд рецептора фактора некроза опухоли 10;
DR – рецептор смерти;
NKG2D – рецептор группы натуральных киллеров;
PD-1 – рецептор программируемой смерти клеток;
STAT – сигнальный белок и активатор транскрипции;
TGF β – трансформирующий ростовой фактор бета;
IFN- γ – интерферон-гамма;
JAK – янус-киназа;
MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа;
LFA – гетеродимерный интегрин подсемейства β 2-интегринов;
ICAM – молекула клеточной адгезии;
FACS – флуоресцентно-активированный клеточный сортинг;
УЦ – ультрацентрифугирование;
ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия;
СЭМ - сканирующая электронная микроскопия;
AUC - площадь под кривой;

CRC – колоректальный рак;

AVV – аденоассоциированный вирус;

ДНКазы I - дезоксирибонуклеаза I.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в терапии онкологических заболеваний происходит смещение фокуса на использование собственных ресурсов организма, в частности, реактивацию Т-клеток пациента, которые утратили способность эффективно отвечать на опухолевые антигены. Существующими методами лечения онкологических заболеваний являются использование ингибиторов иммунных контрольных точек и терапия би-специфическими антителами для нацеливания иммунных клеток на клетки опухоли. Несмотря на очевидный прогресс по сравнению с традиционными подходами, заключающимися в уничтожении клеток опухоли с помощью химио- или радиотерапии, даже эти более эффективные методы не всегда успешны. Поэтому особый интерес представляет развитие клеточной адаптивной иммунотерапии, для которой можно применять Т-клетки аутологичного или аллогенного происхождения. Наиболее стремительно развивающейся ветвью этого направления является создание и введение онкологическим пациентам Т-клеток, модифицированных химерным антигенным рецептором. Эти химерные рецепторы, обладающие высокой аффинностью к опухолевому поверхностному антигену, перенаправляют Т-клетки пациента или здорового донора таким образом, что они специфически узнают и убивают клетки опухоли. Несмотря на высокую эффективность адаптивной иммунотерапии, которая часто является терапией последней надежды, в ряде случаев функция CAR Т-клеток оказывается снижена под действием иммуносупрессивного опухолевого микроокружения (Tumor MicroEnvironment, TME). В понятие TME входит несколько механизмов, которые по-разному (за счет секреции растворимых факторов, наличие на поверхности клеток опухоли ингибиторных молекул, привлечения иммуносупрессорных популяций лимфоидных и миелоидных клеток), влияют на противоопухолевый иммунитет. Факторы микроокружения, которые активно исследуют в настоящее время, ингибируют деление, а, следовательно, экспансию, и персистенцию CAR Т-лимфоцитов в организме реципиента. Поэтому изучение влияния опухолевого микроокружения на CAR Т-лимфоциты является чрезвычайно важной задачей с фундаментальной и практической точек зрения. Ведь создание CAR Т-клеток, устойчивых к негативному действию иммуносупрессорного микроокружения, а также разработка препаратов, направленных на факторы микроокружения (например, внеклеточные ловушки нейтрофилов), позволит существенно увеличить эффективность клеточной терапии опухолей. Не менее актуальной проблемой

является совершенствование технологий получения CAR T-клеток *ex vivo*, так как именно эта стадия в процессе создания CAR T-клеточного продукта в значительной степени определяет эффекторную цитолитическую функцию T-клеток и их выживание в условиях опухолевого микроокружения. Понимание механизмов, участвующих в формировании опухолевого микроокружения, а также поиск мишеней и методов, позволяющих нарушить или обойти влияние микроокружения на иммунные клетки, является ключом к успешному лечению онкологических заболеваний. В последнее время появились данные, что одним из важных компонентов опухолевого иммунного микроокружения являются внеклеточные везикулы (экзосомы), которые в большом количестве выделяют опухолевые клетки. Эти мембранные пузырьки, отделяющиеся от поверхности клеток, содержат набор белков и нуклеиновых кислот, которые могут оказывать негативное влияние на активацию клеток иммунной системы, в том числе и CAR T-клетки. Еще одним важным элементом ТМЕ являются опухоль-ассоциированные нейтрофилы, 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 ТМЕ может потенциально расширить фундаментальные представления о развитии опухолевых заболеваний и предложить новые мишени и подходы противоопухолевой терапии.

В данной работе представлены результаты исследований по трем смежным направлениям. Во-первых, это новые данные по влиянию несущих антиген внеклеточных опухолевых экзосом (Extracellular Vesicles, EV) на функционирование специфичных к ним CAR T-клеток. Вторая часть посвящена разработке метода получения и использования искусственных антиген-содержащих микровезикул (Antigenic Vesicles, AV) для активации и размножения *in vitro* CAR T-клеток. Последняя часть доказывает, что использование препаратов на основе нуклеаз, направленных на такой фактор микроокружения, как внеклеточные сети нейтрофилов (neutrophil extracellular traps - NET) может замедлить или остановить рост ряда опухолей. В литературном обзоре обсуждены современные представления о биологии CAR T-клеток, клиническом применении этой революционной клеточной терапии онкологических заболеваний и иммуносупрессорных свойствах опухолевых микровезикул.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. CAR T-лимфоциты и опухолевое микроокружение

T-клетки являются важнейшим компонентом системы приобретенного иммунитета, они необходимы для узнавания антигенов, входящих в состав патогенов, уничтожения зараженных вирусом клеток, убийства опухолевых клеток и для осуществления эффективного гуморального ответа. Кроме этого, продуцируемые T-лимфоцитами цитокины стимулируют фагоцитоз и функции нейтрофилов. Уникальные функции и антигенную специфичность T-лимфоцитов определяют T-клеточные рецепторы (TCR) (1), которые формируются в тимусе в результате процессов позитивной и негативной селекции. Смысл тимусной селекции заключается в рекомбинации сегментов генов субъединиц TCR T-клетками и отборе функциональных T-клеток, которые не узнают собственные (свои) пептидные антигены (2,3).

Эксперимент проведенный в 1960 году Евой и Джорджем Кляйн, впервые позволил установить, что клеточные компоненты иммунной системы могут вызывать отторжение опухолей (4,5). Кляйн и коллеги использовали химический канцероген для индукции опухолей у мышей. После хирургического удаления сформировавшихся опухолей, они иммунизировали прооперированных животных их собственными облученными опухолевыми клетками. Иммунизованным таким образом мышам прививали живые раковые клетки, и было продемонстрировано, что иммунная система мыши отторгает раковые клетки только в том случае, если они происходят из исходной опухоли. Дальнейшие эксперименты на мышах по адоптивному переносу T-клеток способствовали идентификации опухолевых антигенов и выяснению основных факторов, препятствующих формированию эффективного противоопухолевого иммунитета (6–8). Результаты этих и сходных экспериментов в 1986 году вдохновили группу Розенберга на клиническое применение адоптивного переноса клеток, включая использование аутологичных активированных IL-2 киллерных лимфоцитов (9) или инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (*tumor infiltrating lymphocytes*, TIL) (10) для лечения солидных опухолей человека. Исследователи выделяли TIL из смеси клеток меланомы пациента, проводили их экспансию *ex vivo* и вводили обратно пациенту. Выяснилось, что эти T лимфоциты были избирательно реактивны к антигенам опухолевых клеток. Было показано, что введение TIL

не только эффективно при терапии меланомы, но и что ТИЛ могут проникать через гематоэнцефалический барьер и вызывать регрессию метастазов в головном мозге (11). Однако, успехи применения ТИЛ для терапии меланомы является скорее исключением. Как было показано позже, инфильтрирующие опухоль лимфоциты отсутствуют при большинстве типов рака, следовательно, их использование имеет ограниченный потенциал в качестве способа лечения опухолевых заболеваний (12). Возникшие проблемы привели к поиску альтернативных аллогенных методов терапии, таких как инфузия донорских лейкоцитов (13) и противовирусная терапия пациентов с иммунодефицитами вирус-специфичными Т-клетками (14). Несмотря на то, что аллогенные донорские Т-клетки иногда элиминируют гематологические злокачественные новообразования посредством эффекта трансплантат против лейкемии (GVL), они нередко вызывают серьезные осложнения, известные как реакция трансплантат против хозяина (GVHD) (15).

Как результат, пионерские работы в области клинического применения адаптивной иммунотерапии привели к пониманию корректного состава терапевтических Т-клеточных продуктов, которые должны содержать значительную пропорцию опухолеспецифических Т-клеток при отсутствии Т-клеток, опасных для пациента (16).

1.2. Развитие технологии CAR-T

Общей чертой подходов к адаптивной иммунотерапии в конце 20-го века является акцент на отборе и экспансии собственных не-модифицированных Т-клеток пациентов или здоровых доноров. Развитие методов генной инженерии и доставки рекомбинантных ДНК для модификации Т-клеток существенно изменили вектор развития адаптивной иммунотерапии. Появление псевдовирусных векторов (не способных к саморепликации) (17) способствовало развитию методов генетической модификации лимфоцитов с целью создания Т-клеток, несущих химерные антигенные рецепторы или секретирующих цитокины для эффективного подавления роста опухоли (18). Модифицированные лимфоциты, выделенные из пациента или здорового донора, являются биомедицинским клеточным продуктом, сконструированным и перепрофилированным путем генетических манипуляций *ex vivo* (Рис. 1) (19,20).

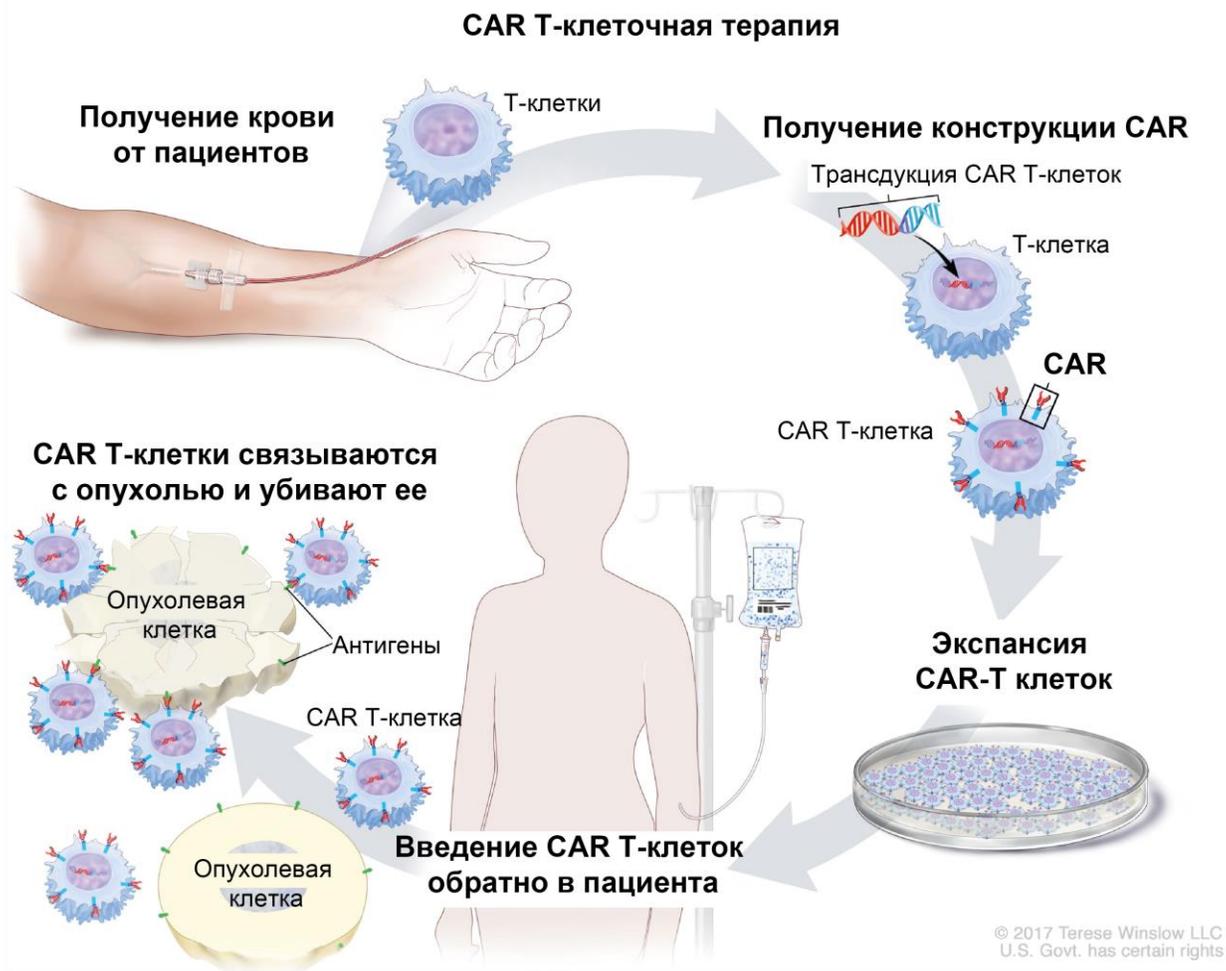


Рисунок 1. Схематическое изображение процесса создания CAR-T клеточного продукта (адаптированная версия рисунка, с сайта National Cancer Institute cancer.gov)

Развитие терапевтической Т-клеточной инженерии потребовало прогресса сразу по нескольким направлениям, таким как поиск новых опухолеспецифических маркеров, конструирование антигенных рецепторов, технология выделения и модификации Т-клеток, а также создание новых законов и правил для использования клеточных продуктов. Таким образом, в основе этого иммунотерапевтического метода лечения лежит не только иммунология, но и генетика, синтетическая биология, биология стволовых клеток, целый ряд этических норм и производственных процессов.

На сегодняшний день существует множество различных подходов к дизайну и получению Т-клеток, модифицированных химерным антигенным рецептором (CAR Т-клеток) (21). Конструкции CAR, как правило, создают, используя переменные фрагменты одноцепочечных антител (scFv), распознающих опухолевый антиген. Первым появлением CAR, как концепции, можно назвать работу Зелига Эшхара 1980-ого года (22), в которой описано конструирование и экспрессия генов химерных Т-клеточных рецепторов (сейчас называемых CAR первого поколения). Данные CAR содержали внутриклеточную часть константных фрагментов α и β цепей TCR в форме химерного белка с переменными доменами антитела (SP6), узнающего 2,4,6-тринитрофенол (TNP). Это позволило придать сконструированным Т-клеткам, несущим на поверхности такой рецептор, специфичность к выбранному опухолеспецифическому антигену. Причем узнавание молекулы-мишени происходило независимым от главного комплекса гистосовместимости (МНС) способом. Данный подход оказался неудачным как *in vitro*, так в клинических исследованиях, поскольку модифицированные Т-клетки имели сниженную способность к активации и пролиферации при узнавании мишени CAR (23,24).

Первыми работами, описывающими успех терапии на основе CAR Т-клеток второго поколения являются работы группы Майкла Саделейна (25–28). Можно сказать, что введение отвечающих за передачу сигнала частей ко-стимуляторных молекул в состав конструкции CAR позволило создать настоящие «живые лекарства», которые составляют основу современной терапии CAR Т-клетками. Дизайн и отбор удачных вариантов CAR второго поколения был основан на переборе огромного количества вариантов структуры рецепторов, различающихся и по антигенной специфичности, и по комбинациям ко-стимулирующих и сигнальных внутриклеточных доменов, необходимых для активации Т-клеток. Уже известно более сотни антиген-специфичных CAR, которые содержат, как минимум, восемь различных ко-стимулирующих доменов (29). Наиболее изученными CAR второго поколения являются молекулы, в состав которых входят ко-стимулирующие домены CD28 или 4-1BB (30). Эти варианты конструкции CAR позволяют получать Т-клетки с различными функциональными особенностями. CAR на основе CD28 способствует ускоренной пролиферации Т-клеток, повышенному метаболизму глюкозы, клетки с этими рецепторами относительно недолго персистируют в организме. В то же время, CAR на основе 4-1BB слабее индуцирует цитотоксические функции Т-клеток, но

одновременно стимулируют окисление липидов и поддерживает более продолжительную персистенцию Т-клеток (30–32). Эти различия иллюстрируют возможность дифференциального репрограммирования Т-клеток с использованием CAR второго поколения. При разработке CAR стараются учитывать структурные особенности, присущие разным шарнирным и трансмембранным частям молекулы, которые сильно влияют на связывание антигена и передачу сигналов (25).

Первые клинические исследования CAR Т-клеток были проведены на солидных видах рака, в них показана возможность возникновения побочного эффекта CAR Т-клеток, называемого в литературе *on-target-off-tumor*, когда антиген-специфическая цитотоксичность CAR Т-клеток направлена против нормальных тканей (33,34). Первый опыт применения CAR для лечения В-клеточных форм онкогематологических патологий принадлежал Саделайну (34). К сожалению, клиническое исследование было проведено на группе взрослых пациентов, один из которых умер по причине, не связанной с инфузией CAR Т-клеток, что вызвало закономерный скепсис и негативное отношение к перспективе CAR-T терапии. Из-за этого на клинические исследования Саделайна был наложен трехлетний запрет. В течение этого бана было проведено первое успешное клиническое применение CAR Т-клеток на детях другой группой ученых. Авторами работы были сотрудники Пенсильванского университета из группы Карла Джуна, который руководил разработкой технологии CAR Т-клеток совместно с Дэвидом Портером и Стефаном Группом в 2011-2012 гг. Они впервые ввели CD19-CAR Т-клетки пациентам с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) (35) и острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) (36). Поворотным моментом в одобрении клинического применения CAR Т-клеток принято считать терапию 7-летней Эмили Уайтхед с рецидивирующим и рефрактерным ОЛЛ, которую считали обреченной и собирались перевести в хоспис. В 2012 году она стала первым пациентом, вылеченным CD19-CAR Т-клеточной терапией, ее случай помог оживить исследования в области CAR-T, которые были на грани провала (37). CAR Т-клетки, с успехом примененные группой Джуна, специфически узнавали антиген CD19 на поверхности В-клеток, и, на сегодняшний момент, они являются самым распространённым вариантом применяемой CAR-T клеточной терапией.

Дальнейшее развитие химерных антигенных рецепторов было направлено в сторону улучшения параметров персистенции, активности и экспансии CAR Т-клеток, повышения

их эффективности в борьбе с солидными видами опухолей. CAR третьего поколения, по сравнению с CAR второго поколения, обладали улучшенными эффекторными функциями и персистенцией *in vivo* (38,39). CAR четвертого поколения, так называемые TRUCK (Т-клетки, перенаправленные на инициируемый антигеном выброс цитокинов), используемые в качестве носителей для секреции и накопления цитокинов в опухолевой ткани позволили осуществлять контролируемую и сайт-направленную доставку эффекторных молекул в опухолевую ткань, обходя проблемы, возникающие при системном введении CAR Т-клеток (40,41). Дальнейшее повышение безопасности терапии CAR Т-клетками может быть достигнуто с использованием би- или три-специфичных CAR Т-клеток, либо с помощью, так называемых, «умных» Т-клеток, в которых экспрессия химерного антигенного рецептора и выброс провоспалительных цитокинов напрямую связаны с наличием и концентрацией опухолевого антигена (42,43). Наконец, применение технологии генетического редактирования генома, основанная на использовании метода CRISPR/Cas9 (кластерных регулярно размещенных коротких палиндромных повторов/ нуклеазы Cas9), для модификации геномной ДНК Т-клеток способно еще больше повысить эффективность и безопасность CAR Т-клеток (44).

1.3. Активация химерного антигенного рецептора

CAR Т-клетки, в отличие от обычных эффекторных Т-клеток, могут распознавать белковые, гликопротеидные и липидные молекулы (антигены), расположенные на поверхности клеток-мишеней. В отличие от TCR, белковые антигены-мишени CAR, не должны быть расщеплены на отдельные пептиды и представлены на поверхности клеток молекулами МНС. Внутриклеточная часть CD3 ζ комплекса TCR/CD3 и CAR схожи, но архитектура внеклеточных доменов этих рецепторов сильно отличается (Рис. 2) (45).

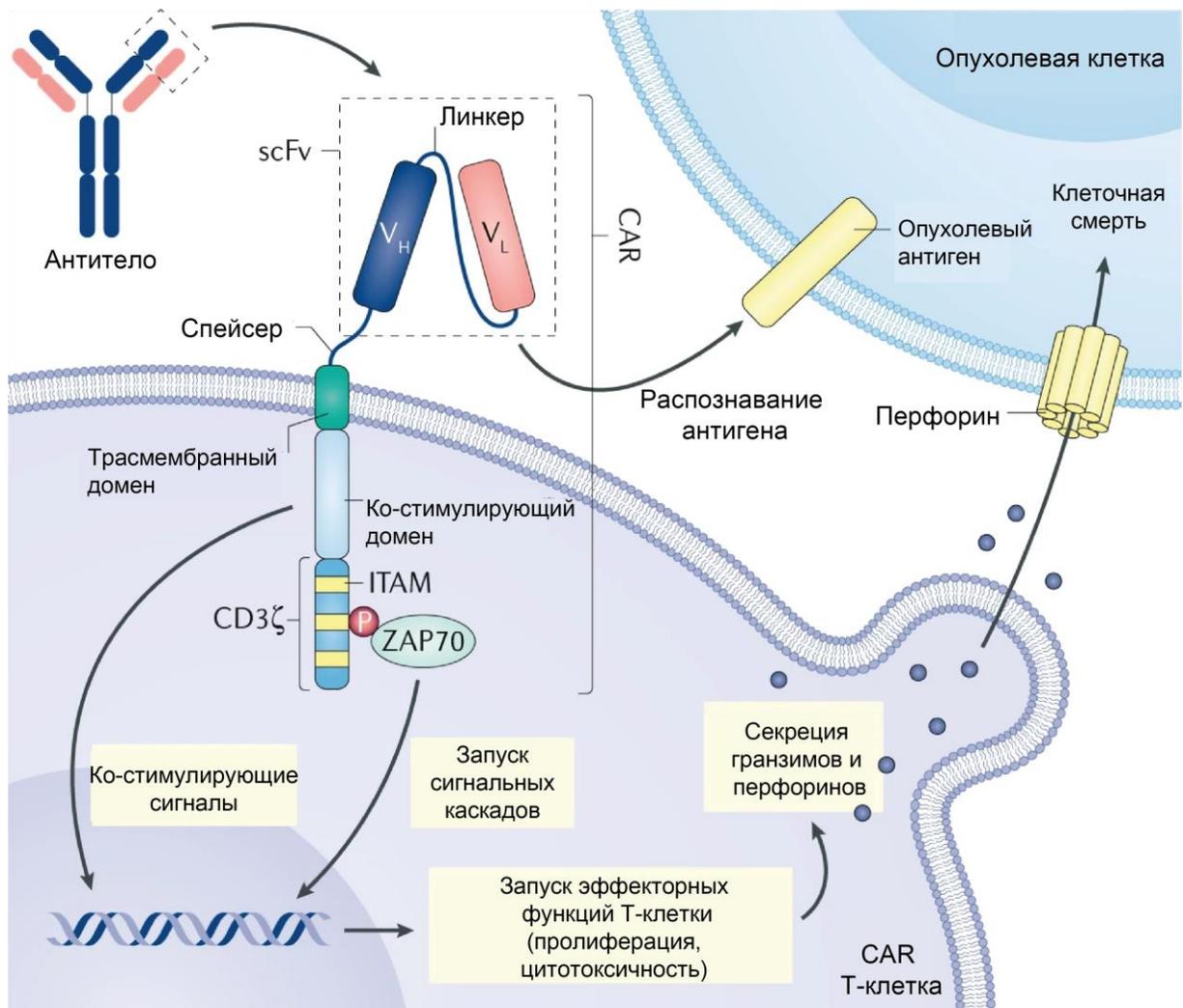


Рисунок 2. Структура конструкции химерного антигенного рецептора и описание процесса активации CAR T-клетки при распознавании специфичного антигена. (адоптированный рисунок (46))

Механизм активации TCR изучен не полностью, но появляется все больше свидетельств действия TCR как механорецептора - конформационные изменения в TCR/CD3 приводят к смещению киназно-фосфатазного баланса в области иммунологического синапса (47). TCR и его лиганд pMHC являются относительно небольшими молекулами, и связывание TCR с pMHC приводит к вытеснению части рецепторов из «зон тесного контакта», которые исключают более крупные белки, такие как CD45, обладающий фосфатазной активностью

(48). Зависимое от размера вытеснение части рецепторов изменяет баланс киназ и фосфатаз в непосредственной близости от TCR/CD3, что приводит к фосфорилированию CD3. Как и в случае с взаимодействием TCR-pMHC, CD45 вытесняется из иммунного синапса при связывании CAR Т-клетки с опухолевой; следовательно, механизмы сегрегации белков также могут быть важны для передачи сигналов через CAR. В отличие от TCR, для активации которого не требуется образование мультимеров pMHC (49), олигомеризация CAR является важным этапом в инициации активации Т-клетки (50). TCR и CAR реагируют только тогда, когда они связывают лиганд с определенной силой и достаточное количество времени находятся в связанном состоянии (51). Данная особенность имеет важное значение для оптимизации дизайна CAR с точки зрения чувствительности и специфичности. Для передачи сигнала CAR и TCR используют схожие наборы сигнальных молекул, включающие киназы семейства PLC γ , Zap-70, LAT и Src (52). Однако, чувствительность CAR и TCR различна: для активации Т-клетки через TCR требуется образование как минимум одного комплекса TCR-pMHC; в случае CAR требуется по крайней мере, сотня взаимодействий, даже несмотря на то, что CAR имеют значительно более высокое сродство к антигенам, чем TCR (53). Изучение особенностей передачи сигнала через CAR и TCR, сходства и различия структур, передаваемых сигналов и активируемых сигнальных каскадов, являются чрезвычайно актуальной и интересной научной проблемой.

Ответ Т-лимфоцитов, в том числе и CAR Т-клеток, на стимуляцию антигеном можно разделить на три основных этапа: распознавание антигена и экспансия клеток, персистенция клеток в периферической крови, сокращение Т клеточной популяции и образование клеток памяти (54). На первом этапе наивные Т-клетки делятся и дифференцируются в эффекторные Т-клетки, которые приобретают способность продуцировать IFN γ , TNF α и цитотоксические белки (гранзимы и перфорин). При распознавании CAR Т-клеткой опухоли происходит антиген-опосредованная активация CAR Т-клетки и запуск ее цитолитических эффекторных функций, первая из которых - это экзоцитоз цитотоксических гранул, содержащих перфорин и гранзимы (Рис. 2). Чтобы обеспечить быстрое и направленное уничтожение инфицированной или злокачественной клетки-мишени, цитотоксические гранулы прикрепляются к микротрубочкам эффекторной клетки. После образования иммунологического синапса гранулы перемещаются и сливаются с плазматической мембраной в области cSMAC (центральный

супрамолекулярный активационный кластер) (55). Цитолитическое содержимое везикул высвобождается в щель иммунологического синапса, где перфорин вызывает образование пор на мембране клетки-мишени, чтобы облегчить проникновение проапоптотических гранзимов. Попадая в цитоплазму клетки-мишени, гранзимы индуцируют каспазозависимую апоптотическую гибель клеток, расщепляя ключевые белки-субстраты (56). Второй цитолитической функцией Т-лимфоцитов является экспрессия лигандов семейства фактора некроза опухоли (TNF), которые могут вызывать рецептор-зависимый апоптоз клеток-мишеней (57).

После стадий распознавания антигена и экспансии наступает этап сокращения Т-клеточной популяции, в которой большинство эффекторных Т-клеток умирают, выживают ~ 5–10% клеток от общей популяции. Эти клетки входят в третью стадию - фазу «памяти» - и длительное время персистируют за счет сигналов, передаваемых интерлейкинами ИЛ-7 и ИЛ-15 (58). Хотя среди долгоживущих Т-клеток существует значительная гетерогенность, их обычно делят на три субпопуляции: Т-клетки с резидентной памятью (T_{rm}), эффекторной памятью (T_{em}) и центральной памятью (T_{cm}). Различия в их локализации и эффекторных функциях позволяют обеспечивать перекрывающиеся уровни защиты от потенциального повторного заражения. Экспансия CAR Т-клеток отличается от физиологичного пути ответа Т-клеток. Во-первых, экспансия CAR Т-клеток *ex vivo* включает стадии, с которыми не сталкиваются Т-клетки *in vivo* - трансдукция Т-клеток лентивирусами и стимуляция CD3/CD28 в присутствии рекомбинантных интерлейкинов. Во-вторых, экспансия CAR Т-клеток происходит *ex vivo* в виде поликлональной популяции, независимо от специфичности эндогенного TCR (59). Следовательно, это ведет к образованию ещё более гетерогенной популяции CAR Т-клеток, которая также содержит клетки, находящиеся в разных по степени активации/дифференцировки состояниях. Несмотря на эти различия, CAR Т-клетки памяти могут сохраняться в крови пациентов от месяцев до нескольких лет, что зависит от исходного состояния Т-лимфоцитов и конструкции химерного рецептора.

1.4. Подходы к экспансии и пролиферации CAR Т-клеток

Несмотря на впечатляющие успехи CAR-Т иммунотерапии в лечении онкологических заболеваний, на пути к созданию эффективного CAR Т-клеточного продукта лежит много проблем. Существующие неудачи в применении CAR Т-клеток в клинической практике связаны с недостаточным уровнем выживания и персистенции CAR

Т-клеток, быстрым истощением, ускользанием опухоли от иммунного ответа и негативным влиянием опухолевого микроокружения. Также одной из серьезных проблем в CAR T-терапии является получение адекватного количества CAR T-клеток высокого качества при стимуляции и размножении донорских Т-клеток *ex vivo*. Контроль качества CAR T-клеточного продукта осуществляется на всех стадиях производства. Опираясь на многолетний опыт создания CAR T-клеток, в научном сообществе сформировалось понимание, на какие характеристики стоит обращать внимание для увеличения эффективности CAR T-клеточной иммунотерапии (60)

Первым важным аспектом, определяющим стабильность CAR-T после введения пациенту является популяционный состав продукта (61). Т-клеточная популяция подразделяется на CD4⁺ и CD8⁺ клетки, которые в процессе активации выполняют взаимодополняющие и перекрывающиеся функции. После активации наивные CD4⁺ Т-клетки дифференцируются в функциональные подмножества, называемые Т-хелперами типа 1 (Th1), секретирующие IFN- γ , и Т-хелперами типа 2 (Th2), продуцирующих интерлейкин-4. В свою очередь, CD8⁺ Т-клетки могут выступать в роли эффекторных клеток и секретировать IFN- γ и TNF- α , или элиминировать клетки-мишени с помощью цитолитических механизмов. Ранее было показано, что и CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки способны убивать опухолевые клоны, однако цитотоксическая активность значительно ниже для CD4⁺ по сравнению с CD8⁺ CAR Т-клетками. Соотношение CD4:CD8 равное 1:1 обеспечивает оптимальную противоопухолевую активность CAR Т-клеток *in vivo*, указывая на синергический противоопухолевый эффект двух подгрупп (62).

Подмножества CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток по их локализации, эффекторным функциям и степени дифференцировки можно разделить на несколько фенотипов. Наивные клетки (T_{naive}), которые созрели и вышли из тимуса, но еще не встретили свои антигены, клетки памяти (T_{scm}, T_{cm} и T_{em}) и терминально-дифференцированные Т-клетки (terminally differentiated T cells -T_{emra}) (Рис. 3).

Клетки памяти периферической крови (PBMC) человека были идентифицированы на основе маркеров клеточной поверхности, в частности, CCR7, рецептора хемокина, который необходим для хоуминга в лимфатические узлы (63). Также выявлены различия в способности подмножеств Т-клеток памяти продуцировать эффекторные цитокины. На основании этих различий были предложены два функциональных подмножества Т-клеток

памяти: CCR7⁺ клетки T_{cm} (центральной памяти), расположенные во вторичных лимфоидных органах, которые после стимуляции антигеном снижают экспрессию CCR7 и мигрируют в периферические органы, становясь эффекторными клетками памяти T_{em}. В свою очередь, CCR7⁻ T_{em}, присутствующие в крови, селезенке и нелимфоидных тканях, способны быстро реагировать на появление антигена и продуцировать эффекторные молекулы. Дополнительно, существуют клетки T_{scm} (T memory stem cells), которые представляют собой самую раннюю и длительную стадию развития Т-клеток памяти и проявляют свойства, подобные стволовым клеткам. Для них характерен профиль экспрессии генов переходный между наивными и центральными Т-клетками памяти. T_{scm} являются долгоживущей и самообновляющейся субпопуляцией.

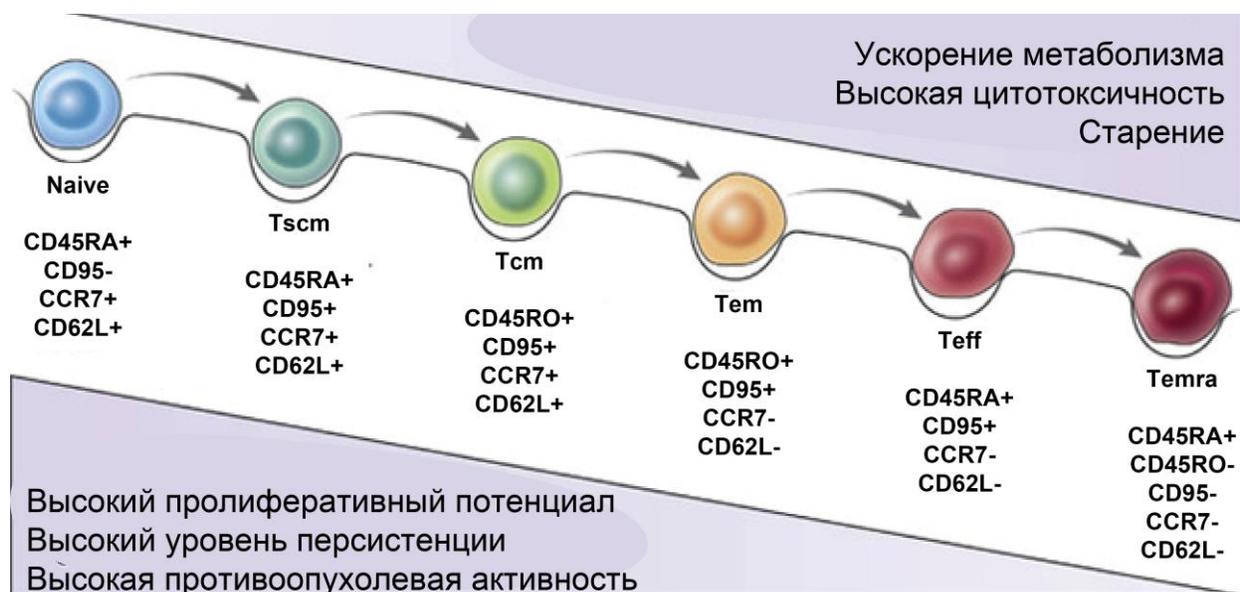


Рисунок 3. Процесс дифференцировки Т-клеток (адоптированный рисунок (64))

Многочисленные исследования продемонстрировали преимущества адоптивного переноса CAR Т-клеток T_{naive} фенотипа, по сравнению с T_{cm} или T_{em}. При оценке эффективности CAR-Т терапии у пациентов с ХЛЛ, успех терапии коррелировал с количеством CAR Т-клеток с наивным фенотипом: пациенты, достигавшие полной ремиссии содержали больший процент наивных Т-клеток, по сравнению с теми пациентам, которые продемонстрировали частичный ответ на иммунотерапию (65).

T-лимфоциты, обладающие наивным фенотипом, обычно обладают высокой скоростью пролиферации, во то время как повышенная цитотоксичность наблюдается для терминально-дифференцированных T-клеток. Однако, T_{emra} чаще всего характеризуют как истощенные T-клетки, которые постепенно теряют функциональность. Для истощенных T-клеток характерен повышенный уровень ингибирующих рецепторов PD-1, CTLA-4, и TIM-3 на поверхности, который часто видят у T-клеток пациентов с хроническими инфекциями и онкологическими заболеваниями (66). Неудивительно, что продолжительность создания терапевтических CAR T-клеток также оказалась фактором, коррелирующим с успехом терапии - чем меньше времени требуется для производства CAR T-клеток, тем выше вероятность, что популяция сохранит свое цитотоксические свойства и останется в частично дифференцированном состоянии (67). Другой важной особенностью истощения T-клеток являются изменения в передаче сигналов через TCR, профиле экспрессии цитокинов и хемокинов, а также путях миграции T-клеток. Ранее считалось, что истощение T-клеток невозможно остановить, но в настоящее время хорошо известно, что это обратимый процесс (68). Как результат, блокада путей, индуцирующих истощение CAR T-клеток, может восстановить их пролиферативную активность.

Как было сказано ранее, применение в производственном процессе цитокинов или низкомолекулярных ингибиторов также влияет на фенотип и размножение CAR T-клеток. Первоначально для экспансии CAR T-клеток использовали IL-2, учитывая его мощное стимулирующее и пролиферативное действие на T-клетки. Однако, длительное воздействие IL-2 приводит к получению популяции T-клеток с терминально дифференцированным фенотипом (69). Использование IL-7, IL-15, IL-18 и IL-21 для производства CAR T-клеток оказалось более эффективным. В клинической практике применение IL-7 и IL-15 позволяет сохранить больше CAR T-клеток с фенотипом T_{scm}. Процент менее дифференцированных CAR T-клеток при этом коррелировал с уровнем экспансии и стабильностью цитотоксической функции CAR T-клеток у пациентов с лимфомой (70). Преимущество IL-15 также заключается в синергическом эффекте этого цитокина при использовании в комбинации с другими цитокинами (71).

Кроме IL-2 и других цитокинов, для активации и стимуляции пролиферации T-клеток используют сильную неспецифическую стимуляцию моноклональными антителами (mAb) к CD3 и CD28, которая по результату похожа на взаимодействие T лимфоцита с

антиген-презентирующей клеткой (72,73). CD3/CD28 антитела иммобилизуют на поверхности культурального пластика, полимерных магнитных шариков (74,75) или на сложных каркасах из нанотрубок (67,76–78). Основным недостатком неспецифической активации состоит в активации всех Т лимфоцитов в культуре, а не только CAR-положительной популяции. Стоит отметить, что иммобилизация антител на полимерной структуре делает невозможной их подвижность после связывания с TCR, а значит сигнал активации отличается от антигенной стимуляции на клеточном уровне. Частично этой проблемы можно избежать, используя фидерные клетки, несущие опухолевый антиген (79). Стимуляция с использованием фидерных клеток обеспечивает дополнительные сигналы ко-стимуляции и секрецию цитокинов, которые способствуют более корректному развитию CAR Т-клеток (76). Недостатком данной технологии является необходимость использовать живые клетки, что значительно повышает требования к биобезопасности и добавляет трудоемкие этапы в процесс производства CAR-T (72).

Производство CAR Т-клеток является крайне важным этапом адоптивной иммунотерапии и, как было описано ранее, может существенно повлиять на клинический исход применения модифицированных Т-лимфоцитов. Однако, после введения пациенту благоприятные условия, тщательно создаваемые при производстве CAR-T, сменяются враждебным “полем боя”, на котором главным противником является иммуносупрессорное микроокружение опухоли.

1.5. Опухолевое микроокружение

Концепция опухолевого микроокружения (ТМЕ) впервые была опубликована в 1863 году, когда Вирхов предложил связь между воспалением и раком. В 1889 году появилась теория Педжета о метастазировании рака, так называемая теория «семя и почва», которая утверждает, что распространение рака по организму не является случайным (80–82). В 2011 году Ханахан и Вайнберг расширили понимание принципов возникновения опухолевых заболеваний на основе огромного прогресса в доступных им знаниях. Предлагаемые признаки рака были расширены с шести до десяти, одним из них стало участие опухолевого микроокружения в развитии рака (83).

ТМЕ включает нетрансформированные клетки, сосуды, лимфоидные органы или лимфатические узлы, нервы, межклеточные компоненты (матрикс) и метаболиты, расположенные в центре, на краю или в непосредственной близости от опухолевого очага.

Классическая теория предполагает, что онкогенные мутации клеток вызывают инициирование рака, вследствие чего происходит неограниченная и неконтролируемая пролиферация опухолевых клеток, возникает резистентность к апоптозу и стимуляция ангиогенеза, способствующая инвазии и метастазированию, а также изменение метаболизма клеток (77). Эти изменения возникают при сотрудничестве между различными клеточными и неклеточными элементами опухоли, определяющими опухолевое микроокружение (ТМЕ), что приводит к трансформации здоровых клеток и высвобождению различных межклеточных коммуникаторов, включая цитокины, хемокины и везикулы. Активный рост опухоли может привести к локальной гипоксии и повышению уровня лактата. Данные факторы способны существенно подавлять активность и пролиферацию эффекторных Т-клеток. Гипоксия опухолевой клетки приводит к повышению уровня активных форм кислорода, что дополнительно снижает стабильность генома и нарушает репарацию ДНК (84). Основную часть стромы опухолевого микроокружения составляют опухоль-ассоциированные фибробласты. Изменяя свой фенотип и секретируя различные факторы роста, они влияют на пролиферацию раковых клеток, что делает опухолевое окружение более канцерогенными. Кроме клеток стромы в области опухолевого микроокружения присутствуют различные клетки иммунной системы. Важным компонентом ТМЕ, оказывающим значительное влияние на иммунный контроль опухолей являются инфильтрирующие опухоль лимфоциты (tumor infiltrating lymphocytes, TIL) и NK-клетки (85). С одной стороны, наличие TIL является свидетельством противоопухолевого иммунного ответа. Однако, наличие TIL в опухоли не всегда коррелирует с благоприятным прогнозом, так как TIL могут подавляться опухолевым микроокружением за счет взаимодействия с ингибиторами иммунных контрольных точек (PD-1/PDL-1, CTLA-4), опухолевыми везикулами и другими компонентами микроокружения опухоли (86). На данный момент выявлены различные субпопуляции инфильтрирующих иммунных клеток с прямой цитотоксической, иммуностимулирующей или иммуносупрессивной функциями. Инфильтрация лимфоцитов может привести к иммунной поддержке или подавлению ТМЕ, в зависимости от доминирующей субпопуляции клеток.

Наиболее распространенными антигенпрезентирующими клетками в опухолевом микроокружении являются резидентные макрофаги, которые можно разделить на

противоположные фенотипы – M1 и M2 (87). В зависимости от фенотипа они могут стимулировать или подавлять адаптивный иммунитет, однако, присутствие макрофагов в опухоли коррелирует с плохим прогнозом для пациента. Рекрутируемые первичной опухолью макрофаги позволяют (активируя ангиогенез) увеличить метастатический потенциал, то есть повышают вероятность миграции, инвазии и интравазации опухолевых клеток. Кроме макрофагов, в ТМЕ также присутствует большое количество опухоль-ассоциированных нейтрофилов. Детальное понимание сигналов, которые заставляют нейтрофилы становиться иммуносупрессивными, открывает большие перспективы для перепрограммирования ТМЕ. Уникальный механизм нетоза (образование NET – neutrophil extracellular traps, внеклеточных ловушек нейтрофилов) может оказаться многообещающей терапевтической мишенью. NET состоят из цепей деконденсированного хроматина, выделяемого активированными нейтрофилами. Длина фрагментов хроматина превышает 15 т.п.о., и они организованы в трехмерные сетчатые структуры, расположенные вне клеток. Накопленные данные свидетельствуют о том, что NET являются «главными действующими лицами» при прогрессировании рака: клетки опухоли провоцируют нейтрофилы производить больше NET, что способствует росту и делению клеток опухоли, инвазии и метастазированию (88). Доклинические модели демонстрируют, что разрабатываемые лекарственные средства на основе ингибиторов активации нейтрофилов или нуклеаз, разрушающих NET, ингибируют рост опухолей в доклинических моделях, однако достоверных клинических данных пока нет.

Внеклеточные везикулы (extracellular vesicles, EV) также являются важной составляющей опухолевого микроокружения. В связи с новыми данными о происхождении, составе и результатах действия на клетки внеклеточных везикул, понимание их функции и значения сильно изменилось - из разряда клеточного «мусора» они превратились в новый способ межклеточного взаимодействия. Оказалось, что эти структуры внутриклеточного (как правило) происхождения активно участвуют в регуляции иммунного ответа, а также в других процессах, требующих обмена информацией между клетками (89,90). Чрезвычайно важным этапом в «биографии» везикул стало обнаружение новой функции - переноса генетического материала (как правило, в форме различных типов РНК), который попадает в клетки-мишени, модулирует фенотип и функцию клеток на генетическом и эпигенетическом уровнях (89). Стоит подчеркнуть, что опухолевые клетки выделяют

значительно больше везикул, по сравнению с нормальными клетками окружающей ткани, что можно связать с ускоренной пролиферацией в условиях стресса (91–93). Многие факторы могут влиять на продукцию везикул клетками, так, например, известно, что условия низкого рН в опухолевом микроокружении важны для поддержания стабильности липидно-холестеринового состава везикул (94). Изменение количества везикул, а также их состава, хорошо коррелирует с прогнозом и тяжестью течения многих заболеваний, что позволяет использовать их для неинвазивной диагностики (95).

1.6. Характеристика экзосом как части опухолевого микроокружения

Являясь частью клеточного окружения, везикулы участвуют, по-видимому, в дифференцировке, делении и поддержании/изменении фенотипа клеток, как в норме, так и при различных патологиях, в том числе, при различных видах онкологических заболеваний (90). Несмотря на то, что опухолевые везикулы в основном подавляют иммунную систему и способствуют развитию опухоли, одновременно они содержат опухолевые антигены. Это свойство везикул потенциально может быть использовано в иммунотерапии для стимуляции противоопухолевого ответа (96).

Под термином «внеклеточные везикулы» объединяют структуры клеточного происхождения размером от 30 до 1000 нм, окруженные билипидным слоем. Везикулы относят к разным типам по их усредненным размерам и биохимическому профилю (наборам входящих в их состав компонентов). В настоящий момент, точная классификация типов везикул осложнена трудоемкостью их получения в чистом виде и физического разделения отдельных типов везикул (97). Теоретически, внеклеточные везикулы можно классифицировать по размеру или происхождению (98,99):

- 1) Экзосомы – структуры диаметра 30-150 нм эндосомального происхождения, несущие характерные маркеры семейства тетраспанинов (CD9, CD63, CD81) и шапероны.
- 2) Микровезикулы – частицы цитоплазматического происхождения, являющиеся отделившимися частями плазматической мембраны клетки размером от 100 до 1000 нм.
- 3) Апоптотические тельца – большие (1000-5000 нм) части клеток, формирующиеся в процессе апоптоза.

Везикулы содержат набор белков, которые являются характерными маркерами определенной клеточной линии, из которой они были выделены. К примеру, белки тубулины присутствуют на везикулах, выделенных из клеток рака легкого (100), а CD20 на

везикулах В-клеточной лимфомы (101). В попытках понять весь спектр влияния опухолевых EV на иммунные клетки, был подробно изучен белковый и липидный состав везикул, который более подробно представлен на Рисунке 4. Для любых опухолевых EV характерно наличие белков-тетраспанинов - CD63, CD81, CD9 количество которых может варьировать в зависимости от типа опухоли и стадии прогрессии (102). На мембране везикул также можно обнаружить комплексы гистосовместимости МНС I и II классов (Рис. 4), что особенно важно в случае везикул, выделяемых антиген-презентирующими клетками (antigen presenting cells, APC) (103,104). Кроме белков и липидов в везикулы попадает и генетический материал: ДНК, рибосомные РНК, матричные РНК, микроРНК и другие некодирующие РНК (89). Не до конца изучен механизм, благодаря которому нуклеиновые кислоты загружаются в EV, но обнаружено присутствие определенных «бар-кодов» - коротких последовательностей в микроРНК и РНК, характерных именно для РНК, выделяемых из везикул (105–107).

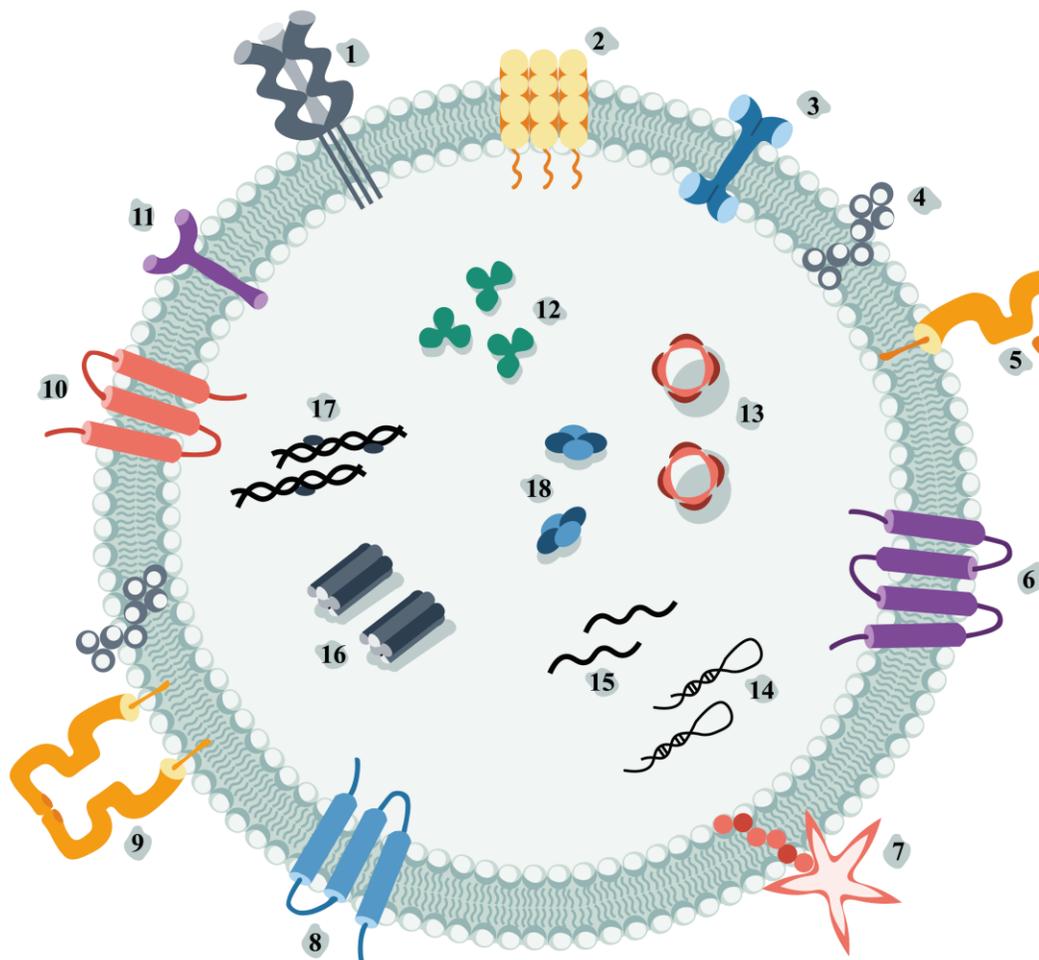


Рисунок 4. Схематичное представление белкового состава типичной внеклеточной везикулы (на рисунке представлены самые распространённые компоненты опухолевой везикулы): молекулы адгезии (интегрины (11), тетраспанины (6,7,8,10)), сигнальные молекулы (синтетины, аннексин V(3)), молекулы комплекса гистосовместимости (MHC II класса(5), MHC I класса(9)), белки цитоскелета (актин, миозин (16)), белки теплового шока (12), липидные структуры (церамид (4)), белки, связанные с формированием везикул (AUX/Alix(13)), белки метаболизма (GAPDH(18)) и др.

Примечания: 1 – FasL; 2 – ICAM-1; 3 – аннексин V; 4 – церамид; 5 – MHC I класса; 6 – тетраспанин CD81; 7 – CD80; 8 – тетраспанин CD9; 9 – MHC II класса; 10 – тетраспанин CD63; 11 – интегрины; 12 – белки шапероны, белки теплового шока (HSP); 13 – AUX/Alix; 14 – микроРНК; 15 – мРНК; 16 – актин, миозин; 17 – ДНК с белками гистонами; 18 – GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase)

1.7. Биогенез везикул и взаимодействие с таргетными клетками

Экзосомы и микровезикулы образуются в клетке различными путями. Микровезикулы отделяются от цитоплазматической мембраны клетки при участии белков цитоскелета (актин, миозин и др.), белка N-SMase (нейтральная сфингомиелиназа участвующая в образовании церамида), а также ARF6 (фактор АДФ-рибозилирования 6) и фосфолипазы PLD2 (108,109). Как в формировании микровезикул, так и экзосом принимает участие эндосомальный комплекс сортировки (ESCRT), который сортирует убиквитинилированные белки в мультивезикулярные тельца (Multivesicular Bodies, MVBs). ESCRT состоит из четырех белковых компонентов (ESCRT-0, -I, -II, и -III), которые последовательно связывают белки для формирования внутриклеточных везикул (95). Вспомогательные белки синдекан–синтетин–ALIX (ALG-2-interacting protein X), в свою очередь, инициируют отщепление экзосомы от мембраны MVBs (110). По существующим данным, альтернативным путем биогенеза EV является образование гликолипопротеиновых доменов (липидных рафтов), в состав которых входит сфингомиелиназа N-SMase. Синтез церамида сфингомиелиназой и его накопление в мембране приводит к слиянию рафтов и образованию экзосомы в полости MVBs (111). Экзосомы, находящиеся в полости MVBs, выделяются во внеклеточное пространство посредством слияния мембран клетки и MVBs, и этот процесс регулируется ГТФазами семества Rab и Ras, а также белком SNAPE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) (106,112).

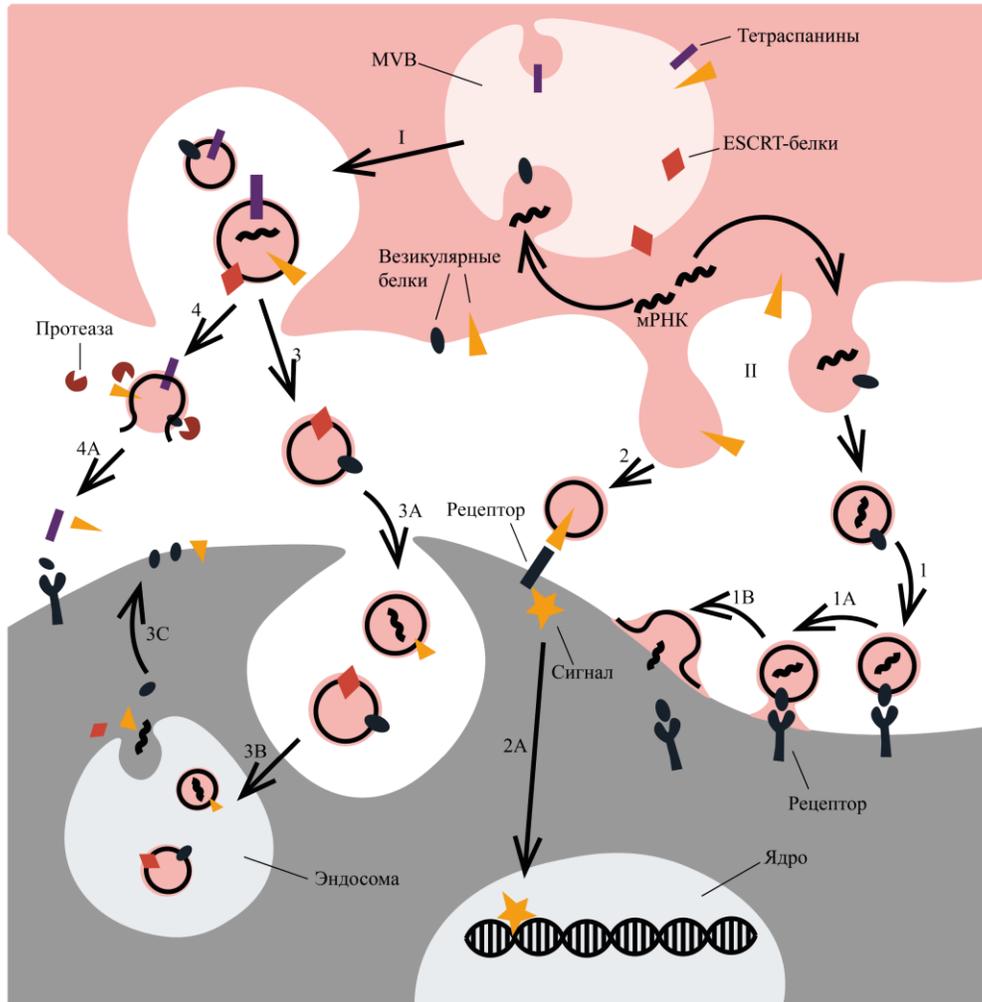


Рисунок 5. Биогенез внеклеточных везикул и их поглощение таргетными клетками.

Пути биогенеза внеклеточных везикул (I,II). I - Образование экзосом в мультивезикулярном тельце (MVBs) при участии ESCRT-зависимого/ ESCRT-независимого путей биогенеза– слияние MVBs с цитоплазматической мембраной клетки; II – Образование микровезикул путем отделения от цитоплазматической мембраны клетки.

Пути поглощения внеклеточных везикул таргетной клеткой (1,2,3,4). 1 – взаимодействие лиганда на поверхности EV с клеточным рецептором с дальнейшим эндоцитозом везикулярного содержимого; 1A – слияние везикулярной и клеточной мембран; 1B – высвобождение везикулярного содержимого в цитоплазму клетки; 2 – взаимодействие везикул с клеточными рецепторами; 2A запуск внутриклеточных сигнальных каскадов; 3 – выделение внеклеточной везикулы; 3A – фагоцитоз везикулы; 3B – образование эндосомы с везикулярным содержимым; 3C – интернализация везикулярных компонентов клеткой-реципиентом. 4 – Отщепление под действием протеаз мембранных

везикулярных белков; 4А - взаимодействие везикулярных белков с клеточными рецепторами;

Существование нескольких путей образования EV подтверждается многими исследованиями (113) (Рис. 5). Так, в клетках, лишенных ESCRT белков, наблюдалось образование MVB. Стоит отметить, что выделенные везикулы обладали нестандартным составом и морфологией (111). Ингибирование или нокаут сфингомиелиназы N-SMase уменьшает продукцию везикул клетками, а в случае опухолевых клеток, снижает уровень метастазирования и ангиогенеза в опухоли (114). Однако, самостоятельное образование EV в результате ESCRT-независимого пути с участием сфингомиелиназы вызывает сомнение, так как подтверждено, что образование липидных рафтов не требуется для формирования экзосом (115). Несмотря на то, что биогенез EV теоретически разделяют на ESCRT-зависимый и ESCRT-независимый пути, образование определенной популяции EV может зависеть в разной степени от каждого из них (97,116).

Функции EV в опухолевом окружении могут быть различными, но практически все они, так или иначе, реализуются при контакте везикулы с таргетной клеткой (90). Везикулы могут переносить к поверхности или доставлять внутрь клеток белковые молекулы, по меньшей мере, четырьмя разными способами (117) (Рис. 5):

- 1) Контакт между специфическими экспонированными на внешней стороне мембраны белками везикул с рецепторами клеток-реципиентов приводящих к активации внутриклеточных сигнальных каскадов;
- 2) Отщепление поверхностных везикулярных белков под действием внеклеточных протеаз и их дальнейшее взаимодействие с мембранными рецепторами клеток;
- 3) Слияние везикулярной и клеточной мембран с последующим высвобождением внутривезикулярного содержимого в цитоплазму клетки, либо с образованием эндосомы;
- 4) Фагоцитоз и интернализация целой везикулы клеткой-реципиентом;

Взаимодействие везикулярных белков-тетраспанинов, протеогликанов, лектинов и интегринов с рецепторами клетки-реципиента запускает процесс проникновения везикулы в клетку, который возможно заблокировать специфическими антителами к определенному везикулярному белку. К примеру, обработка везикул антителами к CD81 или CD9, а также

блокировка протеогликанов сульфатом гепарина снижает уровень адгезии везикул к клетке-реципиенту. Процесс эндоцитоза везикулы клеткой также можно заблокировать цитохалазином В или латранкулином А, которые ингибируют компоненты цитоскелета (актин, фибронектин) (90). Секретция везикул и их проникновение в клетку — это процессы, которые до настоящего времени были исследованы и охарактеризованы, по большей части, *in vitro*, поэтому необходимо их дальнейшее изучение *in vivo*, которое позволит определить физиологическую роль влияния везикул на окружающие клетки.

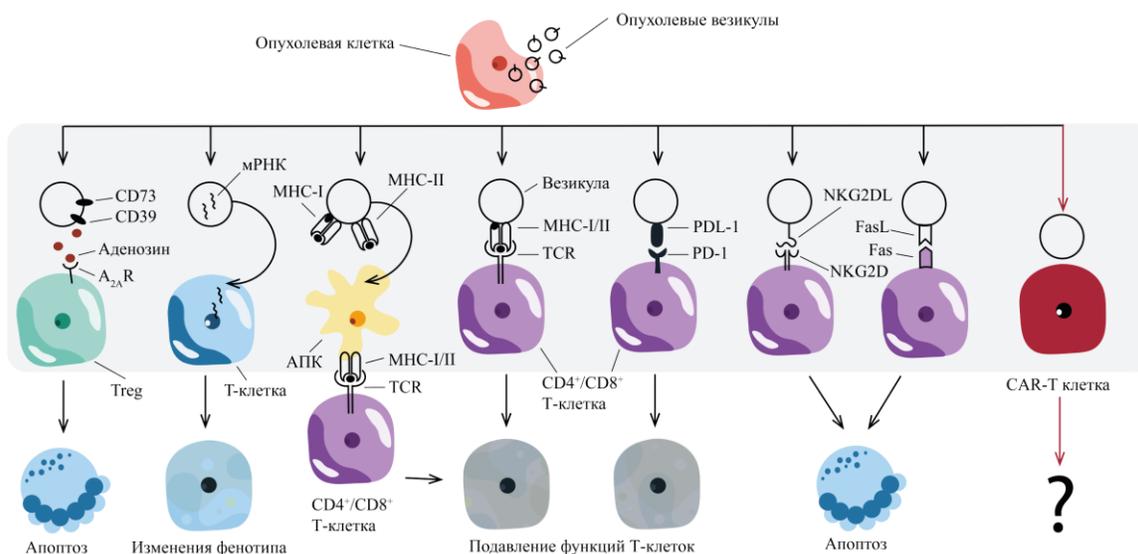


Рисунок 6. Влияние опухолевых везикул на различные популяции Т-лимфоцитов.

На рисунке представлены эффекты, которые секретируемые опухолевые везикулы могут оказывать на Т-клетки.

1.8. Иммунный ответ и роль опухолевых экзосом

В опухолевом окружении присутствуют разные популяции клеток, формирующие строму и иммунологическое окружение. Комплекс реакций иммунного ответа осуществляют Т-лимфоциты, которые не только инициируют, стимулируют ($CD4^+$ Т-лимфоциты) или регулируют (регуляторные Т-клетки, Treg) иммунный ответ, но и разрушают инфицированные или опухолевые клетки ($CD8^+$ Т-киллеры, цитотоксические Т-лимфоциты). Логичным завершением Т-клеточного иммунного ответа является уничтожение опухолевых клеток и образование клеток памяти. В свою очередь, опухолевые

клетки пользуются различными способами «ускользания» от иммунного ответа, одним из которых, по существующим данным, является выделение опухолевых везикул.

Идентифицированы следующие механизмы, посредством которых опухолевые везикулы могут способствовать избеганию иммунного ответа опухолями (117) (Рис. 6):

(1) Активация апоптоза у $CD8^+$ цитотоксических лимфоцитов.

(2) Смещение фенотипа $CD4^+$ клеток в сторону Treg лимфоцитов.

(3) Передача везикулами и презентация опухолевого антигена клетками, которые не являются профессиональными АПК, или незрелыми АПК, которые, в отсутствие ко-стимулирующих сигналов, вызывают анергию Т-лимфоцитов.

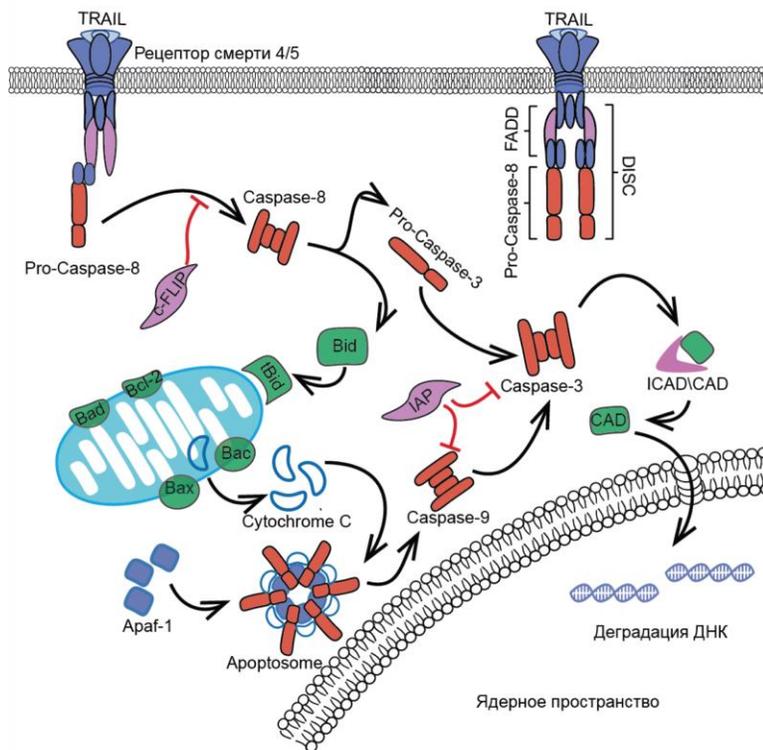
(4) Регулируемое подавление Т-клеточного иммунного ответа, который, в свою очередь, зависит от разных механизмов.

(5) Перепрограммирование макрофагов в M2 фенотип (поддерживает опухоли).

(6) Снижение скорости пролиферации NK-клеток.

Выделение опухолевыми клетками EV, несущих на себе факторы активации апоптоза, является одним из основных механизмов иммуносупрессии. Апоптоз является сложным энергозависимым процессом, который основан на каскаде молекулярных превращений. На данный момент известно, что существуют два возможных пути развития апоптоза: рецепторный и митохондриальный. После формирования комплекса DISC (death inducing signaling complex) апоптотический сигнал передается на инициаторные каспазы. При активации инициаторных каспаз 8/10, в составе комплекса DISC происходит дальнейшая активация эффекторных каспаз 3 и 7, проявляющих ферментативную активность, а то есть гидролиз остатка Asp в тетрапептидном мотиве (Рис. 7).

Митохондриальный путь апоптоза чаще всего активируется внутриклеточными факторами в ответ на различные сигналы: разрушение ДНК, появление активных форм кислорода, накопление белка с нарушенным фолдингом и др. Данный процесс регулируется белками семейства Bcl-2. К семейству таких белков относится фактор Bid, который активируется путем протеолиза под действием каспазы - 8. В активированной форме tBid вызывает пермеабиллизацию митохондриальной мембраны, выход цитохрома C и



формирование апоптосомы, вызывающей активацию инициаторной каспазы 9, что в дальнейшем также вызывает активацию эффекторных каспаз (118) (Рис. 7).

Рисунок 7. Схема передачи сигнала при апоптозе (рецепторный и митохондриальный пути)

Рецепторный и митохондриальный пути приводят к активации цитоплазматических эндонуклеаз

(разрушающих ДНК) и протеаз (разрушающих внутриклеточные белки). Сами каспазы 3, 7 и 6 непосредственно протеолизуют цитокератин и плазматическую мембрану, что обуславливает морфологические изменения, которые наблюдаются в любой апоптотической клетке.

Опухолевые EV, несущие на себе высокоактивный мембранный белок FasL, при инкубации с Fas⁺ Т-клетками способствуют выделению в цитозоль цитохрома С, потере мембранного потенциала митохондриями, активации каспаз и фрагментации хроматина в Т-клетках. Ко-экспрессия FasL и TRAIL (лиганды, относящиеся к суперсемейству фактора некроза опухоли) на поверхности секретируемых опухолевых EV также приводит к индукции апоптоза у CD8⁺ Т-клеток (119). В свою очередь, экзосомы, полученные из нормальных клеток (фибробластов или дендритных клеток), не вызывают апоптоз активированных CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (120). Экзосомы, выделяемые клетками карциномы, вызывают апоптоз Th1-клеток через галектин-9/Tim-3 взаимодействие (121).

Также, на опухолевых экзосомах могут присутствовать не только лиганды, относящиеся к суперсемейству фактора некроза опухоли, но и их агонисты - рецепторы

смерти 4 и 5 (DR4 и DR5). DR4 и DR5 являются трансмембранными белками I типа и содержат гомологичную цитоплазматическую последовательность – домен смерти (118). DR4 и DR5 присутствуют на многих здоровых клетках, включая клетки тимуса, печени, лейкоцитов крови, активированных Т-лимфоцитах, тонкого кишечника (Рис. 7). Рецепторы смерти были обнаружены на некоторых опухолевых линиях, таких как Jurkat, Ramos, Raji, Colo205 и других (118). Взаимодействие DR4/5 с лигандом TRAIL инициирует процесс апоптоза, в котором ключевую роль играет внутриклеточный домен рецептора смерти, к которому присоединяются адаптерные домены TRADD (белок, ассоциированный с доменом смерти) и FADD (Fas-белок, ассоциированный с доменом смерти). Эти домены принимают участие в присоединении прокаспазы 8/10 и регуляторного белка c-FLIP и образованию DISC. После формирования DISC апоптотический сигнал передается на инициаторные каспазы (118). Некоторые исследования демонстрируют, что молекулы DR5 на поверхности EV, могут конкурировать с DR5 на клетках-мишенях за связывание с TRAIL, что приводит к снижению передачи сигналов апоптоза и возникновению резистентности опухоли к воздействию TRAIL (122).

Экспериментально доказано, что у Т-клеток, присутствующих в опухолевом окружении, также может наблюдаться снижение экспрессии ко-стимулирующей молекулы CD3 ζ , что приводит к анергии Т-клеток и коррелирует с уменьшением выброса таких цитокинов как IL-2, IL-7 и IL-15. Этот эффект на Т-клетки могут оказывать везикулы содержащие FasL⁺, которые, взаимодействуя с Fas⁺ лимфоцитами, снижают количество молекул CD3 ζ и JAK3 (Janus kinase 3, тирозин-протеинкиназа 3) в первично активированных Т-клетках и промотируют переход клеток в апоптотическое состояние (123). Система NKG2D/NKG2DL также играет немаловажную роль в выживании иммунных клеток. Рецептор NKG2D (The Natural Killer Group 2D, рецептор группы 2D натуральных киллеров) присутствует на мембране НК-клеток и CD8⁺ Т-лимфоцитов (124). Лигандом рецептора NKG2DL являются МНС-I-подобные молекулы (такие как CD1a-d, MICA и MICB, ULBP) и UL-16- связывающие белки, которые редко представлены на поверхности нормальных клеток. Появление этих рецепторов на мембране активируется клеточным стрессом (вирусной инфекцией или опухолевой трансформацией клеток) (125). Было показано, что опухолевые EV, несущие различные NKG2DL, связывают NKG2D на

поверхности NK и CD8⁺ T-клеток и приводят к ослаблению цитотоксических функций T-лимфоцитов (117).

Везикулы содержат различные типы РНК, самыми многочисленными и разнообразными видами являются мРНК и микроРНК. В меньших количествах были найдены 18S и 28S рибосомные РНК и ДНК. База данных EchoCarta, основанная на 286 исследованиях, насчитывает около 6 тысяч охарактеризованных микроРНК и мРНК, выделенных из EV (126). Горизонтальный перенос мРНК от везикулы к клетке-мишени может влиять на уровень транскрипции некоторых генов, которые, к примеру, участвуют в подавлении/усилении функций T-клеток, в частности, ответственных за продукцию и секрецию провоспалительных цитокинов и других биологически активных молекул.

Опухоль и её микроокружение активно участвуют в индукции активных Treg, способствуя превращению CD4⁺CD25⁻ наивных T-клеток в CD4⁺CD25⁺ Treg. EV также могут индуцировать CD4⁺CD25⁻ T-клетки к переходу в фенотип CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg клеток. Эта конверсия наивных T-клеток в регуляторные требует фосфорилирования и сопутствующей активации факторов транскрипции Smad2/3 (Similar to Mothers Against Decapentaplegic 2/3) и STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3). Образование Treg приводит к дисбалансу в составе иммунных клеток в опухолевом микроокружении, что индуцирует TGFβ-зависимый механизм апоптоза популяций эффекторных T-лимфоцитов. В свою очередь, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg клетки также могут выделять EV, которые вызывают подавление пролиферации Th1 и CD8⁺ T-клеток и снижение секреции ими IFN-γ (127–129).

При доказанном увеличении количества Treg клеток в опухоли, количество дифференцированных Th1 и Th17 лимфоцитов в то же время уменьшается, что приводит к развитию Treg/Th дисбаланса (130,131). Такой дисбаланс сопровождается обнаружением в таргетных клетках специфических микроРНК miR-29a-3p и miR-21-5p, имеющих везикулярное происхождение (132). Накапливаясь в клетках, данные микроРНК могут влиять на различные сигнальные пути, связанные с подавлением активации T-клеток. Активация MAPK1-пути (митоген-активированной протеинкиназы), STAT3/JAK1 и других путей в CD4⁺ T-клетках посредством везикулярной микроРНК приводит к нарушению цитокинового профиля Th и Th17 клеток, а в случае Treg способствует смене лимфоцитарного фенотипа (133,134).

Влияние везикулярной мРНК на функции Т-лимфоцитов напрямую зависит от того, являются ли Т-клетки наивными или активированными. Обнаружено, что опухолевые везикулы значительно увеличивали уровень экспрессии генов с доказанной функцией регуляции иммунитета у активированных CD4⁺ Т клеток, в то время как у нестимулированных клеток экспрессия генов незначительно возрастала только для FAS1, IL10, PTGS2, и наоборот снижалась для DPP4, CD40LG и NT5E (135).

Антиген-презентирующие клетки (АПК) также могут выделять везикулы. Более того, данные везикулы несут МНС II типа и могут опосредованно стимулировать активированные CD4⁺ Т-клетки. МНС-I⁺ везикулы, полученные из АПК, также могут активировать наивные CD8⁺ Т-клетки (136). Известно, что взаимодействие TCR и МНС при отсутствии ко-стимулирующих сигналов приводит к Т-клеточной анергии, то есть неспособности клеток делиться и секретировать цитокины в ответ на стимуляцию Т-клеточного рецептора (137,138). Установлено, что EV меланомы также могут переносить МНС-I от опухолевых клеток к АПК, с чем сопряжено изменение профиля экспрессии рецепторов на поверхности АПК. Вероятно, цитокины и мРНК везикулярного происхождения оказывают иммуносупрессорный эффект на АПК, что приводит к уменьшению количества МНС-I и молекул CD40 на поверхности клеток. Смещение фенотипа АПК в сторону иммуносупрессорного уменьшает возможность стимуляции цитотоксических Т-лимфоцитов, что также может быть механизмом «ускользания» опухолевых клеток от иммунного ответа.

Из вышеизложенного можно сделать вывод, что разнообразие EV, многообразие их белкового состава, и множественные варианты взаимодействия EV с целевыми клетками характеризует EV как многофункциональную составляющую любого физиологического и патологического процесса. Экзосомы могут выполнять различные функции, в зависимости от их клеточного происхождения - начиная с регуляции иммунных реакций, подавления опухолевой инвазии, и заканчивая ролью межклеточных коммуникаторов. Изучение того, как подобные образования в составе клеточного окружения могут оказывать диаметрально противоположные эффекты, позволит использовать везикулы в качестве мишеней для противоопухолевой терапии или «жидкой биопсии» для диагностики развития опухоли (139). Кроме того, не до конца изучено каким образом опухолевые экзосомы влияют на Т клетки, модифицированные химерным антигенным рецептором.

Вероятно, эффекты, которые антиген-положительные экзосомы могут оказывать на Т-клетки, несущие высокоаффинный рецептор к опухолевому антигену, могут отличаться от описанных ранее функций EV в опухолевом микроокружении. Поэтому в данной работе была поставлена цель исследовать эффект, который опухолевые внеклеточные везикулы оказывают *in vitro* и *in vivo* на Т-клетки в контексте современных методов терапии В-клеточного лейкоза и с помощью Т-клеток, несущих химерные Т-клеточные рецепторы.

Несмотря на описанные ранее успехи в применении CAR Т-клеток, часть пациентов резистентна к терапии CAR-T, что, согласно нашей гипотезе, может объясняться связыванием с поверхностью терапевтических клеток опухолевых везикул, несущих на поверхности антиген В-клеток CD19, который узнает химерный рецептор. Взаимодействие CAR Т-клеток и трансформированных В-клеток, а также эффекты и молекулярные механизмы, определяющие влияние везикул на Т-клетки достаточно просто моделировать *in vitro*, используя опухолевые клеточные линии, а именно линию В-клеточной лимфомы Nalm-6. Использование клеточной и мышинной моделей также позволит также достичь второй задачи данной работы – изучить фундаментальные молекулярные механизмы, обуславливающие иммуносупрессорный эффект опухолевых везикул в условиях Т-клеточной терапии. В данной работе представлены и другие подходы борьбы с иммуносупрессорным действием TME, в частности опухолеассоциированными нейтрофилами. Согласно нашей гипотезе локальное введение DNКазы позволит разрушить сети ДНК, возникающие в результате нетоза, и облегчить проникновение иммунных клеток в область опухолевого микроокружения.

Кроме TME существуют другие проблемы, возникающие в процессе создания эффективного CAR-T клеточного продукта, которые могут потенциально снизить эффективность терапии еще до применения CAR Т-клеток в пациенте. Данные проблемы могут быть решены путем изучения потенциально положительных свойств везикул, несущих опухолевый антиген. Описанный в данной работе метод получения и применения антигенных везикул (AV) для размножения в культуре CAR Т-клеток, с большой вероятностью значительно облегчит, удешевит и ускорит получение эффективных терапевтических CAR Т-клеток с улучшенными характеристиками.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Химические реактивы и сопутствующие материалы.

Реактивы: трис-гидроксиметиламинометан (Трис); персульфат аммония; тетраборат натрия; этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); одно- и двузамещенный фосфат натрия; хлорид натрия; гидроксид натрия; соляная, фосфорная и уксусные кислоты; этиловый (70%, 96%) и изопропиловый спирт; полиэтиленгликоль (ПЭГ); бромистый этидий; β -меркаптоэтанол; глицин, Кумасси синий R-250; акриламид; N',N'-метиленабисакриламид; додецилсульфат натрия (ДСН); хлороформ; мочевиная; диметилсульфоксид (Helicon, Россия); агар; триптон; дрожжевой экстракт (Difco, Великобритания); трипановый синий 0,4% (Biorad, США); поли-L-лизин (Sigma, США); Pluronic F-127 (Sigma, США); уранил ацетат; BSA (Sigma, США); гематоксилин; маркеры размера фрагментов ДНК и молекулярной массы белков: GeneRuler™ 1k DNA Ladder (Fermentas, США), PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, США), PageRuler Plus Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific, США); концентрированные растворы дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (Thermo Scientific, США); буфер для нанесения ДНК на агарозный гель (Евроген, Россия); набор для выделения ДНК из геля Набор Cleanup Standard (Евроген, Россия); набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep (Евроген, Россия); набор для проявления мембраны после вестерн-блоттинга ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham, США); субстрат люциферазы Luciferase Assay Reagent (Promega, США); PEI (Sigma, США); Q5 ДНК полимеразы (NEB, Великобритания); T4 DNA Ligase (Thermo Scientific, США); T4 DNA Ligase Buffer (Thermo Scientific, США); клетки *E. coli* штамма DH5 α (Евроген, Россия); ДНК GeneRuler™ 1k DNA Ladder (Fermentas, США); RNeasy Midi Kit (Qiagen, Германия); кДНК Mint-2 (Евроген, Россия); Polybrene (Invitrogen, США); Dynabeads Untouched Human T Cells Isolation Kit (Invitrogen, США); рекомбинантный IL-2 (Invitrogen, США); HiScribe™ Quick T7 High Yield RNA Synthesis Kit (NEB, Великобритания); AMPure XP (Beckman, США); Spy Cas9 NLS (NEB, Великобритания); P3 Primary Cell Solution Box (Lonza, Швейцария); BCA assay kit (Thermo Fisher, США); Total Exosome Isolation (from cell culture media) (Invitrogen, США); Цитохалазином В (Sigma, США); Nano-Glo Luciferase Assay (Promega, США); раствор для

демаскировки антигена (Vector Laboratories, США); HMDS (REACHEM, Россия); Lenti-X p24 rapid titer assay (Clontech, США); раствор фикола (ПанЭко, Россия); Exosome – Human CD81 Isolation Kit (from cell culture) (Invitrogen, США); коллагеназа D (Roche, Mannheim, Германия); Перколл (GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания, США); концентрат 100 kDa Amicon (Millipore, США); Quanti-luc Gold (Invivogen, Франция); MACSPlex Exosome Kit (Miltenyi Biotec, США); CAR-T Expression Panel (NCounter, США); TRIzol reagent (Qiagen, Германия); CellTrace CFSE reagent (Invitrogen, США); D-люциферин (GoldBio, США); хроматографическая колонка Thermo Scientific™ Acclaim™ PepMap™ 100 C18 LC (Thermo Scientific, США); CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, США); лентивирусные частицы Nunclight red (Miltenyi Biotec, США); RIPA буфер (Thermo Scientific, США); Hoechst 33342 (Sigma, США).

Ферменты: эндонуклеазы рестрикции и соответствующие стандартные буферные растворы (Thermo Scientific, США); Q5 High-Fidelity DNA polymerase (BioLabs, Великобритания); T4 DNA Ligase (Thermo Scientific, США); ДНКаза I (Pulmozyme®, Dornase alfa);

Антитела: CD3-APC/Cy7 (Biolegend, Великобритания), anti-human CD19-PE (Miltenyi, США) anti-human CD63-APC (Sony, Япония); anti-human CD19-HRP (Biorad, США); rabbit anti-human GAPDH (Sigma, США); donkey anti-rabbit-HRP (Sigma, США); anti-human CD63 biotin (Sigma, США); Streptavidin-HRP (Biorad, США); anti-human CD45 (BD Pharmaglin, Сан-Диего, Калифорния, США), anti-human CD4 (Abcam, Cambridge, MA.); anti-human CD8 (Abcam, Cambridge, MA.); anti-human CD107a-PE (BD, США); CD19-FITC (Acro Biosystems, США), anti-human CD4-APC (Biolegend, Великобритания) anti-human CD8-PE (Biolegend, Великобритания); CD19-Fc FITC (R&D Systems, США); anti-human CD45RA-PE (Biolegend); anti-human CD62L-APC (Biolegend, Великобритания); anti-human CD57-PE-Cy7 (Miltenyi, США); anti-human TIGIT-PE-Cy7 (Miltenyi, США); и anti-human PD-1-APC (Miltenyi, США), anti-human CD11b (Biolegend, Великобритания); anti-human Ly6G (Biolegend, Великобритания) (Подробная информация об антителах в Таблице 3)

Плазмидные векторы: pLV2 (Clontech, США); GAG REV VSVG, pLV3 (Clontech, США); pCDH115 (Addgene, США). (подробное описание конструкций в Приложении 2)

Растворы: все растворы готовились на дистиллированной воде или на воде особой чистоты из установки “Milli-Q” (Millipore, США).

PBS (10x): 80.0 г/л NaCl, 2.0 г/л KCl, 14.4 г/л Na₂HPO₄, 2.0 г/л KH₂PO₄, pH 7.2.

TBS (10x): 80.0 г/л NaCl, 2.0 г/л KCl, 30.0 г/л Трис, pH 7.4.

PBST (10x): PBS + 1 мл Tween 20

TBE (10x): 0.89 М Трис, 0.89 М борная кислота, 20 мМ ЭДТА, pH 8.0.

Конъюгатный буфер: PBST, 25г/л обезжиренное сухое молоко

LB (Lauria-Bertani): 10 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl.

LB-агар: LB, 18 г/л агара.

SOB (Super Optimal Broth): 20 г/л триптон, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,5 г/л NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂

SOC (Super Optimal broth with catabolic repressor): SOB + 50mM глюкозы

Двухкратный буфер нанесения образцов: 1% 2-меркаптоэтанола, 4% ДСН, 0.25 М Трис–HCl, pH 6.8; 4 мМ ЭДТА-Na, pH 8.0, 10% глицерина, 0.25 мг/мл бромфенолового синего.

Пятикратный электродный буфер для электрофореза по Леммли: глицин 72 г/л, ДСН 5 г/л, Трис-HCl 6.5 г/л, pH 8.3.

Концентрирующий гель для электрофореза по Леммли: 5% смесь акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% ДСН, 0.125 М Трис –HCl, pH 6.8;

Разделяющий гель для электрофореза по Леммли: 12% смесь акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% ДСН, 0.375 М Трис–HCl, pH 8.9. N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин до концентрации 0.1%,

Буфер для создания AV: DMEM, 10% FBS, 1% Pluronic F-127

Среды для культивирования эукариотических клеток: FreeStyle (Invitrogen, США); RPMI Media 1640 (Gibco, США), Среда DMEM с глюкозой 4,5 г/л с глутамином (ПанЭко, Россия) Opti-mem (Gibco, США), Fetal Bovine Serum (HyClone, США), Раствор DPBS (ПанЭко, Россия), 0,05% Трупан-EDTA (Gibco, США), Среда RPMI-1640 с глутамином (ПанЭко, Россия); Fetal Bovine Serum (HyClone, США); GlutaMax (Gibco, США) раствора антибиотика/антимикотика (Gibco, США); PBS (ПанЭко, Россия); ТехMACS; козья сыворотка (Vector Laboratories).

Антибиотики: Раствор натриевой соли ампициллина в воде с концентрацией 100 мг/мл; раствор тетрациклина в воде с концентрацией 20 мг/мл; водный раствор зеоцина с концентрацией 50 мг/мл.

2.2. Работа с нуклеиновыми кислотами

2.2.1. Амплификация ДНК методом ПЦР

Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе Bio-Rad T100 Thermal Cycler (США) в объёме 50 мкл. Готовили инкубационную смесь следующего состава:

5X буфер для Q5 ДНК полимеразы (BioLabs, Великобритания);

по 10 пМ каждого праймера (Евроген, Россия); (см. Таблица 4)

10X раствор дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP) (Thermo Scientific, США);

1-2 ед. Q5 High Fidelity DNA полимеразы (BioLabs, Великобритания);

1-5 нг ДНК.

Амплификацию проводили по следующей схеме:

Таблица 1. Стадии ПЦР

Блок А: Предварительная денатурация	95°C; 3 мин
Блок Б:	25 циклов
Денатурация	95°C; 30 сек
Отжиг праймеров	XX C; 30 сек
Элонгация	72°C YY мин
Блок С:	
Элонгация	72°C 5 мин

Расчет температуры отжига праймера (XX) производили по формуле:

$$XX = 2^{\circ}\text{C} \times n(\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times n(\text{G}+\text{C}) - 5^{\circ}\text{C}.$$

где n - число соответствующих нуклеотидов. Для праймеров длиной более 25 нуклеотидов использовали температуру отжига 65°C или максимальную возможную температуру, определенную экспериментально. Расчёт оптимального времени элонгации (YY) проводили из расчёта скорости работы Q5 ДНК полимеразы 1 т.п.о./мин.

2.2.2. Рестрикция

Рестрикцию плазмидной ДНК и ПЦР продуктов проводили в количестве 1 мкг с помощью различных эндонуклеаз рестрикции в течение одного часа при температуре 37°C в буфере согласно рекомендации производителя (Thermo Scientific, США). Рестрикцию коротких молекул ДНК проводили в течение 3-4 часов. Очистку от эндонуклеаз рестрикции проводили с помощью набора для выделения ДНК Cleanup Standard (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя, либо путем выделения фрагмента из агарозного геля.

2.2.3. Лигирование

Для лигирования использовали набор T4 DNA Ligase и T4 DNA Ligase Buffer (Thermo Scientific, США) согласно инструкции производителя. Лигирование вели в объеме 20 мкл, при молярном соотношении вектора и вставки 1:10, в течение 1-2 часов при комнатной температуре.

2.2.4. Трансформация клеток *E.coli* методом теплового шока

Продуктами лигирования (лигазными смесями) трансформировали компетентные клетки *E.coli* штамма DH5α (Евроген, Россия). К размороженной на льду аликвоте (100 мкл) компетентных клеток добавляли раствор ДНК и инкубировали в течение 30 минут на льду. Затем пробирки с клетками прогревали при температуре 42°C в течение 45 секунд, после чего инкубировали на льду в течение 5 минут. Суспензию клеток переносили в 1 мл теплой среды SOC без антибиотика, инкубировали в воздушном термостате при 37°C 40 минут для репарации клеточной стенки и начала экспрессии генов устойчивости к селективным антибиотикам. Клетки высевали на чашку Петри с LB-агаром и селективным антибиотиком. Чашку Петри помещали в воздушный термостат на 37°C на 14-16 часов.

2.2.5. Выделение плазмидной ДНК

Колонию бактерий переносили в 10 мл LB с добавлением селективного антибиотика и растили при 37°C, с хорошей аэрацией, в течение 16-18 часов. Клетки осаждали центрифугированием в течение 10 минут на скорости 4000 rpm при комнатной температуре. Далее проводили выделение плазмидной ДНК согласно инструкции набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия).

2.2.6. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Для проведения электрофореза использовали 1% агарозный гель, приготовленный на однократном TBE с бромистым этидием в концентрации 0.5 мкг/мл. Пробы смешивали с 4X буфером нанесения (Евроген, Россия) и наносили одновременно с маркером размера фрагментов ДНК GeneRuler™ 1k DNA Ladder (Fermentas, США) в объеме 10 мкл. Электрофорез вели в буфере TBE в камере для гель-электрофореза (Helicon) при силе тока в 100 мА. Разделенные ДНК визуализировали при длине волны 254 нм с помощью трансиллюминатора или системы гель-документации Bio-Rad (США).

2.2.7. Получение последовательностей генов из эукариотических клеток

Для получения последовательностей генов различных опухолюассоциированных антигенов (Her2, CD33, CD19, CD123 и IL13R2a) подбирались праймеры, специфичные к фланкирующим участкам гена (Таблица 4). Из клеток при помощи набора RNeasy Midi Kit (Qiagen, Германия) выделялась тотальная РНК согласно рекомендация производителя. Наличие РНК в выделенных образцах анализировали с помощью гель-электрофореза в агарозном геле. Далее использовали 1 мкг тотальной РНК для постановки реакции обратной транскрипции с помощью набора для синтеза кДНК Mint-2 (Евроген, Россия) для получения кДНК.

Синтезированная кДНК была использована в реакции рестрикции/лигирования для создания генетических конструкций на основе лентивирусных векторов pLV2/pLV3.

2.3. Работа с белками

2.3.1. Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез проводили по стандартной методике Лэммли. Готовили двухкомпонентный гель следующего состава: концентрирующий гель – 5% смеси акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% ДСН, 0.125 М Трис –HCl, pH 6.8; разделяющий гель – 12% смеси акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% ДСН, 0.375 М Трис–HCl, pH 8.9. Для полимеризации сначала добавляли N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин до концентрации 0.1%, а затем персульфат аммония до 0.03%.

Образцы белковых препаратов смешивали с буфером нанесения, содержащим меркаптоэтанол в соотношении 1:1, прогревали 5 минут при 95°C, наносили на гель одновременно с маркерами молекулярной массы белков PageRuler Plus Unstained Protein

Ladder (Thermo Scientific, США), и вели электрофорез при напряжении 90В до перемещения красителя в разделяющий гель, после чего выставляли силу тока 20 мА на 1 пластину геля и вели электрофорез до момента выхода краски из разделяющего геля.

По окончании электрофореза отделяли разделяющий гель, который затем окрашивали Кумасси синим R-250 или проводили перенос белков методом Вестерн блот.

2.3.2. Вестерн блот

Для повышения эффективности разделения, образцы клеток и экзосом смешивали с RIPA буфером (Sigma, США), инкубировали 5 минут при комнатной температуре, смешивали с буфером для нанесения и проводили гель-электрофорез белков в денатурирующих условиях по Лэммли с использованием Pre-stained protein marker (Fermentas, США). Далее отделяли разделяющий гель и проводили перенос на мембрану HyBond C-extra на приборе для полусухого переноса 2117 MULTIPHOR II Electrophoresis UNIT (LKB, Швеция) согласно инструкции производителя. Для этого вырезали мембрану и бумагу Whatman 3ММ размером с гель, и бумагу Whatman 3ММ большего размера геля и все смачивали в буфере для переноса. Помещали на нижний электрод установки для переноса стопку бумаги Whatman 3ММ, сверху мембрану, затем гель, стопку бумаги Whatmann 3ММ, накрывали верхним электродом и вели электроперенос в течение 1 часа при силе тока 0.8 мА/см². По окончании процесса мембрану помещали в блокирующий раствор, содержащий 5% BSA (Sigma, США), и вели инкубацию в течение 2 часов при комнатной температуре. Далее мембрану отмывали 3 раза по 5 минут в PBS-T. Мембрану разделяли на несколько проб и проводили гибридизацию в разных условиях:

1. С антителами aCD19-HRP (Biorad, США) в разведении 1:1000 в конъюгатном буфере (PBS 0.05% BSA),
2. Первичные антитела rabbit anti-human GAPDH (Sigma, США) с последующим добавлением вторичных антител специфичных к иммуноглобулинам кролика donkey anti-rabbit-HRP (Sigma, США)
3. Первичные антитела anti-human CD63 biotin (Sigma, США) с последующим добавлением Streptavidin-HRP (Biorad, США)

После инкубации с антителами мембрану промывали, как было описано ранее. Затем мембрану проявляли с помощью набора ECL Plus Western Blotting Detection System (Amsterdam, США) на приборе геле-документации VersaDoc (BioRad, США).

2.4. Работа с культурами эукариотических клеток

2.4.1. Поддержание в культуре адгезионных эукариотических клеток

Адгезионные клетки культивировали в среде DMEM (Gibco, США) с добавлением глюкозы 4,5 г/л и глутамина (ПанЭко, Россия), 10% фетальной сыворотки Fetal Bovine Serum (HyClone, США), Glutamax (Gibco, США) и раствора антибиотика/антимикотика (Gibco, США) при 37°C, 5% CO₂. Культивирование осуществляли в стерильных 6-ти луночных плашках, либо во флаконах 25 см² или 75 см². При достижении клетками максимальной конfluence (80-90%) их рассеивали на новые флаконы. Перед пересевом клетки промывали 2 раза 5 мл раствора PBS (ПанЭко, Россия), добавляли 500 мкл 0,05% Trypsin-EDTA (Gibco, США), инкубировали 1 минуту, удаляли супернатант и инкубировали в термостате на 37°C в течение 5 минут. После инкубации клетки аккуратно смывали новой средой DMEM, считали и рассеивали на нужное количество флаконов.

2.4.2. Поддержание в культуре суспензионных эукариотических клеток

Клетки культивировали в среде RPMI Media 1640 (Gibco, США) с добавлением глюкозы 4,5 г/л и глутамина (ПанЭко, Россия), 10% фетальной сыворотки Fetal Bovine Serum (HyClone, США), Glutamax (Gibco, США) и раствора антибиотика/антимикотика (Gibco, США) при 37°C, 5% CO₂. Культивирование осуществляли в стерильных 6-ти луночных плашках, либо во флаконах 25 см² или 75 см².

При достижении концентрации клеток более 2.5×10^6 клеток/мл их рассеивали. Для этого, отбирали нужное количество клеток и переносили в стерильный флакон и далее добавляли теплой среды до финального объема 5 мл.

2.4.3. Трансфекция для создания лентивирусных частиц

Трансфекцию эукариотических клеток линии HEK 293T плазмидными векторными конструкциями производили с помощью реагента PEI (Invitrogen, США). Все манипуляции производили в стерильных условиях. Для трансфекции использовали пакирующие плазмиды 2 поколения GAG, REV, VSV-G. За день до трансфекции клетки HEK293T

рассеивали в концентрации 0.6×10^6 /мл, так чтобы в день трансфекции конfluenceность составляла 70-80%. Компоненты для трансфекции брали в соотношении согласно Таблице 2.

Таблица 2. Описание компонентов для трансфекционной смеси.

Плазмиды	Флакон 25 см ²	6w плашка	Флакон 45 см ²
GAG	5,2 mkg	2 mkg	10 mkg
REV	2,6 mkg	1 mkg	5 mkg
VSV-G	1,08 mkg	0,4 mkg	2 mkg
Вектор	5,2 mkg	2 mkg	10 mkg
<i>PEI</i>	<i>21 мкл</i>	<i>8 мкл</i>	<i>60 мкл</i>

Очищенную плазмидную ДНК и пакирующие плазмиды смешивали со средой Opti-MEM (Gibco, США) (Раствор 1), отдельно с Opti-MEM смешивали PEI (Sigma, США) (Раствор 2). После инкубации 5 минут растворы смешивали аккуратным добавлением по каплям Раствора 2 к Раствору 1 и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. После чего раствор по каплям добавляли к клеткам. Через 6 часов инкубации клеткам меняли среду и далее инкубировали в течение 48 часов. Супернатант с вирусными частицами собирали и центрифугировали при 300g в течение 10 минут для удаления клеток. Далее супернатант фильтровали через фильтр 0.45 мкм, переливали в стерильный флакон и хранили на +4 °C либо замораживали в жидком азоте и хранили на -80 °C.

2.4.4. Создание аденоассоциированных вирусных частиц

Аденоассоциированный вирус, кодирующий мДНКазу-1 был получен с использованием трансфекции с помощью реагента PEI (Invitrogen, США). Все манипуляции производили в стерильных условиях. Для трансфекции использовали плазмиды гер/сар, кодирующую капсид Anc80L65, pCLS-014 и пакирующие плазмиды аденовируса. За день до трансфекции клетки HEK293T рассеивали в концентрации 0.6×10^6 /мл, так чтобы в день трансфекции конfluenceность составляла 70-80%. Трансфекцию и сбор вируса проводили как описано ранее. Полученный вирус очищали в градиенте йодиксанола, перерастворяли в PBS с добавлением 35 mM NaCl и 0,001% Pluronic F68 (Gibco, США), и количественным ПЦР выявляли титр, который составлял $1,0 \times 10^{13}$ копий генома/мл.

2.4.5. Определение титра лентивирусных частиц

Для титрования использовали разведения лентивирусных частиц 1:100 и 1:1000. Анализ титра вирусов проводился согласно инструкции набора Lenti-X p24 rapid titer assay (Clontech, США).

2.4.6. Выделение Т клеток

Цельную кровь здоровых доноров разбавляли раствором нагретого до 37°C PBS в 3-5 раз и наслаивали на поверхность раствора фиколла (ПанЭко, Россия), также предварительно нагретого до 37 °С. Центрифугирование осуществляли в течение 45 мин при 650g (с минимальным разгоном и торможением центрифуги) для изоляции мононуклеарных клеток периферической крови (PBMCs). Выделенные PBMC промывали 2 раза PBS, ресуспендировали в 500 мкл изолирующего буфера для выделения Т клеток и делали подсчет клеток. Далее, с помощью коммерческого набора Dynabeads Untouched Human T Cells Isolation Kit (Invitrogen, США), из PBMC выделяли Т-лимфоциты, согласно рекомендациям производителя. Выделенные Т-клетки активировали, добавляя магнитные шарики Dynabeads CD3/CD28 (Life Technologies, США) в соотношении 1:1, и клетки держали в полной среде RPMI (10% FBS), содержащей 30 ед/мл рекомбинантного IL-2 (Invitrogen, США).

2.4.7. Трансдукция эукариотических клеток лентивирусными конструкциями

Трансдукция Т клеток: Активированные Т-клетки через 24 часа после выделения ресуспендировали в концентрации $0,5 \times 10^6$ /мл с добавлением 250 мкл лентивирусного супернатанта (CD19-CAR, IL13Ra2-CAR, CD33-CAR и CD123-CAR) и 30 МЕ/мл IL-2 в 6-луночном планшете с добавлением 1 мкг/мл Полибрена (Millipore, США). Планшеты центрифугировали при 1200g в течение 90 минут при 32°C и далее инкубировали в течение 6 часов при 37°C. Затем культуральную среду меняли на свежую и через 4 дня оценивали уровень трансдукции методом проточной цитофлуориметрии.

Трансдукция клеточных линий: Клетки в концентрации 1×10^6 /мл смешивали с 500 мкл лентивирусного супернатанта в 6-луночном планшете с добавлением 1 микрограмм/мл Полибрена (Millipore, США). Планшеты центрифугировали при 1200g в течение 90 минут при 32°C и инкубировали в течение 6 часов при 37°C. Затем культуральную среду меняли

на свежую и через 4 дня оценивали уровень трансдукции методом проточной цитофлуориметрии.

2.4.8. Получение линии Nalm-6, нокаутированной по CD19

На лидерную последовательность гена CD19 человека были подобраны две гайдовые РНК (gRNA, GGCTCATGAGCTTCCCGGAA и GGGCGGGGACTCCCGAGACC). Данные последовательности были синтезированы в виде праймеров согласно требованиям набора, для получения sgRNA - HiScribe™ Quick T7 High Yield RNA Synthesis Kit (NEB, Великобритания). Предварительно из праймеров методом ПЦР собирали короткие последовательности ДНК, которые отчищали с помощью набора AMPure XP (Beckman, США) и использовали для транскрипции с помощью набора HiScribe™ Quick T7 High Yield RNA Synthesis Kit по протоколу получения коротких транскриптов. Полученные гайдовые RNA (gRNA) очищали с помощью набора AMPure XP (Beckman, США), обрабатывали ДНКазой и оценивали концентрацию на Qubit (США). Далее 2 мкг gRNA смешивали с 3,3 мкл Spy Cas9 NLS (BioLabs, Великобритания) и инкубировали 30 мин при комнатной температуре.

Для получения нокаутных CD19 клеток линии Nalm-6, 1.5×10^6 клеток (с жизнеспособностью более 90%) промывали 2 раза PBS, ресуспендировали в 100 мкл буфера для электропорации (P3 Primary Cell Solution Box (Lonza, Швейцария)) и смешивали с раствором комплекса Cas9-gRNA. Полученная реакционная смесь помещали в кювету для электропорации. Электропорацию проводили на приборе Lonza 4D Nucleofector (Швейцария) с использованием программы EN100. Эффективность нокаута оценивали на 5 день после электропорации. Обогащение популяции нокаутированных клеток проводили с помощью сортировки CD19⁻ клеток на инструменте SH800 Cell Sorter (Sony, Япония). Для создания репортерных линий на основе клеточной линии Nalm-6 CD19⁻, клетки трансдуцировали лентивирусными частицами, кодирующими CD63-GFP или CD63-panoLuc. Уровень продукции химерных белков на основе тетраспонаина CD63 с репортерными молекулами оценивали методом проточной цитофлуориметрии (ACEA Biosciences, США). Обогащение популяции трансдуцированных клеток проводили с помощью сортировки GFP⁺ клеток на инструменте SH800 Cell Sorter (Sony, Япония).

2.5. Получение и характеристика экзосом и везикул

2.5.1. Выделение экзосом методом ультрацентрифугирования

Для наработки экзосом (EV), репортерные клетки доводили до концентрации 2×10^6 /мл в безсывороточной среде и инкубировали 48 часов при 37°C, 5% CO₂. Затем суспензию центрифугировали (300g, 10 мин), из супернатанта удаляли апоптотические тельца (2.000g 20 мин) и микровезикулы (12.000 g 30 мин). Все стадии центрифугирования проводили при 4°C. Полученный «осветленный» супернатант для осаждения экзосом центрифугировали при 100.000g в течение 90 мин при 4°C (центрифуга Beckman L7, США). Полученный осадок, содержащий EV, ресуспендировали в PBS (из расчёта 1 мл буфера на 25мл исходного объема супернатанта). Концентрацию везикул определяли спектрофотометрически при помощи BCA assay kit (Thermo Fisher, США). Обычный выход экзосом/микровезикул составлял примерно 0,5-1 мкг на 1 мл исходного супернатанта.

2.5.2. Выделение экзосом методом осаждения ПЭГом

Для выделения экзосом (EV) клетки Nalm-6 доводили до концентрации 2×10^6 /мл в безсывороточной среде и инкубировали 48 часов при 37°C, 5% CO₂. Затем суспензию центрифугировали (300g, 10 мин), из супернатанта удаляли апоптотические тельца (2.000g 20 мин) и микровезикулы (12.000 g 30 мин). Все стадии центрифугирования проводили при 4°C. Далее супернатант смешивали с реагентом Total Exosome Isolation (from cell culture media) (Invitrogen, США) и проводили выделение экзосом согласно рекомендациям изготовителя. Концентрацию экзосом оценивали при помощи BCA assay kit (Thermo Fisher, США).

2.5.3. Получение искусственных антигенных везикул

Искусственные антигенные везикулы (AV) получали на основе клеточных линий HeLa (CD19, IL13Ra2, CD33, CD123 или HER2) с использованием химического агента цитохалазина В. Для этого клетки HeLa обрабатывали трипсином, промывали PBS, ресуспендировали в 5 мл буфера для получения везикул (VB: DMEM, 10% FBS, 1% Pluronic F-127) в концентрации 1×10^6 клеток/мл и переносили во флакон T25 (Corning, США). Обработка Цитохалазином В (Sigma, США) проводили при концентрации 10 мкг/мл в течение 10 мин при 37°C, 5% CO₂. Далее клеточную суспензию интенсивно встряхивали в течение 30 секунд. Полученную суспензию дважды центрифугировали (4°C, 100 g в течение

5 мин). После этого, AV собирали из супернатанта центрифугированием (4°C, 3000g, 20 мин), ресуспендировали в VB и анализировали методом проточной цитофлуориметрии на проборе NovoCyte 2060 (ACEA Biosciences, США).

2.5.4. NTA анализ

Концентрацию изолированных EV, а также распределение частиц по размерам определяли методом NTA с использованием прибора NanoSight LM10-HS (Malvern Panalytical Ltd, Великобритания), оснащенного лазерным блоком 405 нм, мощностью 65 мВт с пассивным считыванием температуры и высокочувствительной камерой типа EMCCD Andor Luca. (Андор, Белфаст, Великобритания). Все измерения были выполнены в соответствии со стандартом ASTM E2834–12 (2018) с камерой и установками обработки видео, оптимизированными для измерений EV для лазера/камеры, как описано ранее (140)(141). Каждый образец разбавляли до концентрации $1,5 \times 10^8$ частиц/мл. Двенадцать видеороликов (по 60 секунд каждый) были записаны и обработаны с использованием программного обеспечения NTA 2.3 build 33 (Malvern Panalytical Ltd, Великобритания). Результаты всех измерений (всего 4500-6800 треков) были объединены для получения гистограммы размера частиц и общей концентрации частиц, скорректированной на коэффициент разбавления с использованием функции программного обеспечения NTA.

2.5.5. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)

Для оценки размера и формы выделенных экзосом и антигенных везикул (AV) использовали метод ТЭМ. При помощи прибора Emitech K100X (Quorum Technologies, Великобритания) сетки (Ted Pella, США) были предварительно обработаны углеродной пленкой. Образцы наносили на сетки в концентрации 50-100 нг/мкл и инкубировали 3 мин для максимальной адсорбции. Далее, сетки обрабатывали 1% раствором уранил ацетата и высушивали. Для получения изображений использовали электронный микроскоп EM-1400 (Jeol, Япония) 100 kV.

2.5.6. Детекция хемилюминесценции CD63-nanoluc экзосом

Для проведения реакции окисления субстрата использовали набор для детекции хемилюминесценции Nano-Glo Luciferase Assay (Promega, США), содержащий субстрат для фермента нанолуциферазы. Исходный супернатант, супернатант после ультрацентрифугирования и полученную суспензию EV CD63-nanoluc смешивали в

соотношении 1:1 с субстратом Nano-Glo и анализировали на приборе VarioScan (Thermo Fisher, США). Все измерения проводили не менее чем в 5-ти повторностях с соответствующими отрицательными контролями для определения фоновых значений сигнала.

2.5.7. Конфокальная микроскопия

AV, T-клетки или CAR-T-клетки наносили на покровные стекла, покрытые поли-L-лизинном, центрифугировали в течение 10 минут, 100g при комнатной температуре. Прикрепившиеся к поли-L-лизину клетки фиксировали в 4% формалине в течение 1 часа при комнатной температуре и окрашивали антителами anti-human CD3-APC/Cy7 (Biolegend, Великобритания), Hoechst 33342 (Sigma, США) и anti-human CD19-PE (Biolegend, Великобритания). Конфокальные изображения получали с использованием микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Йена, Германия) с конфокальным устройством Yokogawa с вращающимся диском (CSU-X1, Yokogawa Corporation of America, Sugar Land, TX, США).

2.5.8. Сканирующая электронная микроскопия

Для получения дополнительной информации о взаимодействии CAR-T-клеток и AV была проведена сканирующая электронная микроскопия. После воздействия AV (протокол был описан в разделе *Окрашивание клеток с dTomato-AV*) в бессывороточной среде клетки помещали в чашки Петри с покровными стеклами (SPL Lifesciences, Южная Корея) при концентрации 50000 клеток/стекло и инкубировали в течение 30 минут при 37°C, 5% CO₂. После фиксации клеток с помощью 2,5% GA (глутаровый альдегид) в PBS в течение 2 часов при комнатной температуре было выполнено постепенное обезвоживание образцов в 10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90% и 96% этаноле. Далее образцы дважды инкубировали в 200 мкл HMDS (Гексаметилдисилазан) (REACHEM, Россия) по 5 минут при комнатной температуре и один раз - в 100 мкл HMDS с последующим испарением жидкости. На образцы напыляли 20 нм слой золота с использованием ионного устройства для нанесения покрытий Eiko IB 3 (Япония) и исследовали с помощью микроскопа TM3000 (Hitachi, Япония) при 15 кВ. Аналогичный протокол был использован для визуализации AV без клеток.

2.5.9. Анализ искусственных везикул методом жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии

Анализ образцов искусственных везикул проводили методом LC-MS был проведен группой масс-спектрометрии центра коллективного пользования "Биоорганика" ИБХ РАН. Образцы AV наносили на колонку Acclaim PepMap 100 C18 (100 мкм x 2 см) в подвижной фазе (2% ацетонитрил (ACN), 98% H₂O, 0,1% TFA) при скорости 10 мкл/мин и разделяли при 40°C на колонке Thermo Scientific TM Acclaim™ PepMap™ 100 C18 LC с внутренним диаметром 75 мкм с размером частиц 3 мкм. Обратнo-фазовую хроматографию выполняли с помощью системы Ultimate 3000 Nano LC (Thermo Fisher Scientific, США), которая была подключена к масс-спектрометру Orbitrap Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific, США) через источник наноэлектроспрея (Thermo Fisher Scientific, США). Воду, содержащую 0,1% (об./Об.) муравьиной кислоты (FA), использовали в качестве подвижной фазы А, а ACN, содержащую 0,1% (об./Об.), 20% (об./Об.) H₂O, в качестве подвижной фазы В. Элюцию пептидов проводили линейным градиентом: 5–28% В в течение 56 мин; 28–45% В в течение 6 минут, 45–99% В в течение 1 минуты, 99% В в течение 5 минут, 99–5% В в течение 1 минуты при скорости потока 300 нл/мин. После каждой ступени градиента колонку повторно уравнивали буфером А в течение 10 мин. Данные MS были собраны в режиме DDA (TopN = 15). Параметры MS1 были следующими: разрешение 120К, диапазон сканирования 350–1400, максимальное время инъекции - 50 мсек, цель АРУ - 3x10⁶. Ионы выделяли с окном 1,2 m/z, предпочтительным соответствием пептидов и исключением изотопов. Динамическое исключение было установлено на 30с. Фрагментация MS2 проводилась с разрешением 15К при энергии столкновения HCD 28, максимальное время инъекции - 80 мс, цель AGC - 1x10⁵. Другие настройки: исключение заряда - не назначено, 1,> 7. Необработанные спектры обрабатывали с использованием программ MaxQuant 1.6.17.0 (MQ) и Perseus 1.6.15.0. Поиск данных проводился в базе данных Homo sapiens Swissprot, загруженной с UniprotKB, содержащей канонические и изоформные белки, версия от 07.2021. Поиск MaxQuant был выполнен с набором параметров по умолчанию, включая специфичность трипсин/р протеазы, максимум 2 пропущенных расщепления, окисление Met, N-членное ацетилирование белка и дезамидирование NQ в качестве переменных модификаций и карбамидометил-Cys в качестве фиксированной модификации, максимум 5 модификаций на пептид, 1% ПСМ и белок FDR. Были включены следующие опции: второй пептид, совпадение между сериями. Все прогоны были

проанализированы как независимые эксперименты и обработаны в Perseus. В Perseus результаты группы белков были отфильтрованы на загрязняющие вещества, обратные и «идентифицированные только по сайту» белки. Алгоритм iBAQ, реализованный в программе MaxQuant (2), использовался для количественной оценки белков в образце яда. Для получения относительного значения iBAQ (riBAQ), представляющего мольную долю каждого белка, была проведена нормализация значения iBAQ каждого белка относительно суммы всех значений iBAQ.

2.6. Функциональные эксперименты

2.6.1. Проточная цитофлуориметрия

Окрашивание экзосом на поверхностные антигены: Для характеристики паттерна поверхностных антигенов экзосомы были иммобилизованы на anti-CD81-шары согласно протоколу, к коммерчески-доступному набору Exosome – Human CD81 Isolation (from cell culture) (Invitrogen, США). Экзосомы, иммобилизованные на шарах, красили антителами к anti-human CD19-PE (Miltenyi, США), anti-human CD63-APC (Sony, Япония) и CD19 маркер В-клеток человека и далее анализировали методом проточной цитофлуориметрии.

Окрашивание клеток: Для характеристики состава клеточной популяции $0,1 \times 10^6$ /мл клеток центрифугировали в течении 10 мин при 300g, осадок ресуспендировали в PBS. К клеткам добавляли соответствующие антитела в концентрациях, рекомендованных производителем, и инкубировали на льду в темноте в течение 1 часа. Далее клетки промывали 2 раза пятью объемами PBS и ресуспендировали в 100 мкл для дальнейшего цитофлуориметрического анализа на приборе NovoCyte 2060 (ACEA Biosciences, США).

Окрашивание искусственных везикул AV: Для количественного и качественного анализа антигенных везикул был использован метод проточной цитофлуориметрии. К свежевыделенным AV добавляли различные антитела для характеристики поверхностных маркеров и инкубировали в течение 30 мин при 4°C, трижды промывали 500 мкл VB (DMEM, 10% FBS, 1% Pluronic F-127) на скорости 5000g 10 мин, и далее анализировали методом проточной цитофлуориметрии на приборе NovoCyte 2060 (ACEA Biosciences, США).

Окрашивание клеток с dTomato-AV: CAR-T или донорские Т-клетки ресуспендировали в VB в концентрации $0,5 \times 10^6$ / мл. Клетки инкубировали с 20 мкг (~ 5 AV на 1 Т-клетку)

свежевыделенных AV в течение 30 мин при 4°C, трижды промывали 500 мкл VB, а затем анализировали проточной цитометрией на проборе NovoCyte 2060 (ACEA Biosciences, США).

Проточная цитофлориметрия образцов выделенных из опухолей экспериментальных животных: Изолированные опухоли измельчали хирургическими ножницами и гомогенизировали в ферментативном растворе коллагеназы D (1 мг · мл – 1) (Roche, Mannheim, Германия) и ДНКазы I (100 мкг · мл – 1) в течение 30 мин при 37°C в водяной бане с постоянным перемешиванием. Ферментативную реакцию останавливали инактивировали добавлением DMEM с 10% FBS и немедленно центрифугировали клетки при 400 g в течение 5 минут при 4°C. Полученную суспензию фильтровали через сетчатый фильтр для клеток с размером пор 70 мкм и фракционировали с помощью градиента Перколла (GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания, США). Клетки собирали из фракций различной плотности и анализировали методом проточной цитометрии. Популяция CD45⁺ клеток была дополнительно охарактеризована на наличие маркеров Т-лимфоцитов (CD3+/CD4 + и CD3+/CD8+) и нейтрофилов (CD11b+/Ly6G+).

2.6.2. Инкубация CAR Т-клеток в присутствии экзосом (EV)

Для анализа тропности экзосом опухолевых клеток EV по отношению к CAR Т-клеткам, супернатанты репортерных линии клеток U87/CD63-nanoluc и Nalm-6/CD63-nanoluc были добавлены к CD19-CAR и IL13-CAR Т-лимфоцитам. Супернатанты клеток U87/CD63-nanoluc и Nalm-6/CD63-nanoluc концентрировали на мембране 100 kDa Amicon (Millipore, США). Концентрацию экзосом оценивали при помощи BCA assay kit (Thermo Fisher, США). Далее, экзосомы в различных концентрациях добавляли к $0,2 \times 10^6$ Jurkat CD19-CAR и Jurkat IL13-CAR клеткам и инкубировали при 37°C в течение 10 мин. Затем клетки осаждали, промывали и детектировали хемилюминесценцию, с помощью метода, описанного ранее. Аналогичный эксперимент был проведен с экзосомами, очищенными методом УЦ (ультрацентрифугирование).

2.6.3. Анализ эффекторной активности CAR Т-клеток

Анализ цитотоксичности CAR Т-клеток под действием EV: Для анализа высвобождения ЛДГ CD19-CAR-Т-клетки предварительно инкубировали в присутствии CD19⁺ или CD19⁻ EV, выделенных из клеток Nalm-6 или клеток Nalm-6 с нокаутированным

геном CD19 (на 1 CAR T-клетку приходилось 25×10^3 EV). CAR T-клетки обрабатывали экзосомами в течение 48 ч при 37°C и 5% CO₂. Далее CAR T-клетки смешивали с 5×10^3 клеток Jeko-1 (NucLight Red) в соотношениях E:T (5:1, 2.5:1, 1:1 и 1:2) и ко-инкубировали 12 часов при 37°C и 5% CO₂ в полной среде RPMI 1640 с добавлением человеческого IL-2 (30 Ед/мл). Кроме экспериментальных лунок, были поставлены контроли, рекомендованные инструкцией к набору. После инкубации к контрольным лункам (таргетные клетки без CAR T-клеток) добавляли лизирующий буфер и инкубировали в течение 40 мин для достижения полного лизиса клеток. Анализ цитотоксичности проводили согласно протоколу изготовителя с помощью прибора VarioScan (США).

Анализ цитотоксичности CAR T-клеток под действием AV: Для оценки влияния AV на цитотоксичность CAR T-клеток, 5×10^6 CD19-CAR T-клеток инкубировали с CD19-AV либо peg-AV при соотношении T-клетка/AV 10: 1 или 5:1 в течение 4 дней. Для оценки базального уровня цитотоксичности CD19-CAR-T-клетки инкубировали в отсутствие AV. На 4-й день клетки CAR-T собирали центрифугированием (4°C, 300 g, 5 мин) и промывали PBS. Для анализа высвобождения ЛДГ клетки Jeko-1 экспрессирующих красный флуоресцентный белок (5×10^3 клеток на лунку) смешивали с CAR T-клетками, обработанными AV, и контрольными CAR-T при соотношении CAR-T к клеткам-мишеням 10:1, 5:1, 2:1, 1:2 и 1:5 и культивировали в течение 12 часов в полной среде RPMI 1640 с добавлением человеческого IL-2 (30 ед/мл). Кроме экспериментальных лунок, были поставлены контроли, рекомендованные инструкцией к набору. После инкубации к контрольным лункам (таргетные клетки (Jeko-1) без CAR T-клеток) добавляли лизирующего буфера и инкубировали 40 мин. Анализ цитотоксичности проводили согласно протоколу CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, США) изготовителя с помощью прибора VarioScan (США).

Для анализа цитотоксичности CAR-T-клеток, полученных от пациентов с диагнозом Острый лимфобластный лейкоз, CD19-CAR T-клетки инкубировали с CD19-AV и отрицательными AV в течение 7 дней. На 7 день CAR-T-клетки смешивали с клетками Jeko-1 (NucLight Red), как описано выше, и оценивали цитотоксичность CAR-T-клеток с помощью набора CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, США).

Определение активности CAR T-клеток с помощью системы прижизненного анализа клеток Incisycyte: Для анализа 3×10^4 клеток-мишеней Jeko-1 red (NucLight Red) объединяли

с 9×10^4 контрольных CAR T-клеток и обработанных AV. Клетки ко-культивировали в течение 24 часов при 37°C . В качестве отрицательного контроля использовали 3×10^4 клеток-мишеней без добавления эффекторных клеток. Нормализованное количество процента живых клеток в каждой временной точке было рассчитано относительно изначального количества живых клеток на точке 0 ч. Для расчета цитолитической активности CAR T-клеток против клеток-мишеней с течением времени рассчитывалась площадь под кривой (AUC) с помощью программы GraphPad Prism 8.

Анализ длительности цитотоксического потенциала CAR T-клеток «Sequential killing»: 15×10^4 клеток CAR-T, обработанных контрольными peg- AV или CD19-AV смешивали с 50×10^4 клеток-мишеней Jeko-1 (NucLight Red) в 200 мкл полной среды RPMI 1640. Каждые 72 часа, для оценки количества CAR T-клеток и клеток-мишеней смесь анализировали проточной цитометрией. Клетки Jeko-1, растущие без T-клеток служили в качестве отрицательного контроля. Далее, 15×10^4 CAR-T-клеток из предыдущего раунда совместного культивирования смешивали со свежими 50×10^4 Jeko-1 и снова инкубировали в течение 3 дней. Эту процедуру повторяли до исчезновения цитотоксической активности в одном из образцов. Активность CAR T-клеток рассчитывали исходя из изменения количества флуоресцентных клеток методом проточной цитофлуориметрии с добавлением калибровочных шаров.

2.6.4. Детекция секреции провоспалительных цитокинов методом ELISA

Анализ секреции провоспалительных цитокинов CAR T-клетками под действием EV: Для анализа высвобождения цитокинов 5×10^4 клеток CD19-CAR инкубировали со свежeweделенными Nalm-6 CD19+ или Nalm-6 CD19- экзосомами (на 1 CAR T-клетку приходилось 25×10^3 EV) в течение 24ч в 96-луночном планшете в отсутствие IL-2. В качестве отрицательного контроля CD19-CAR T-клетки инкубировали без добавления экзосом. По окончании инкубации супернатант отделяли от клеток центрифугированием (4°C , 300 g, 5 мин), переносили в новый планшет и проводили ИФА. Секрецию IL-2 и IFN γ анализировали с помощью наборов цитокин-специфичного ИФА («Вектор-бест», Россия) в соответствии с инструкциями производителя.

Анализ секреции провоспалительных цитокинов CAR T-клетками под действием AV: Для анализа высвобождения цитокинов CD19-CAR или IL13-CAR T клеток (5×10^4 клеток в лунке) инкубировали со свежeweделенными антиген-положительными или peg-AV при

соотношениях CAR T-клеток к AV 10:1, 5:1 или 1:1 в течение 24 ч в 96-луночном планшете. В качестве контроля CD19-CAR и IL13-CAR T-клетки смешивали с HeLa CD19 и HeLa IL13R2a в 10:1, 5:1 или 1:1. Базальные уровни секреции IFN-g и IL-2 были измерены в образцах CAR-T, не подвергавшихся стимуляции. Супернатант отделяли от клеток центрифугированием (4°C, 300 g, 5 мин), переносили в новый планшет и проводили ИФА. Секрецию IL-2 и IFN γ человеческими CAR T-клетками анализировали с помощью наборов цитокин-специфичного ИФА («Вектор-бест», Россия) в соответствии с инструкциями производителя.

2.6.5. Люциферазный эксперимент на клетках Jurkat-NFAT-luc

Инкубация экзосом с клетками Jurkat: 100 мкл супернатанта клеток Nalm-6 CD63-Luc смешивали с $0,5 \times 10^6$ Jurkat модифицированными CD19-CAR или IL13-CAR и инкубировали при 37°C или 4°C. Во время инкубации отбирали временные точки 10 мин, 30 мин, 1 час, 4 часа в объеме 20 мкл: клетки осаждали, промывали изотоническим буфером и смешивали в соотношении 1:1 в 96-луночной плашке с люциферинем NanoGlo (Promega, США) и измеряли уровень хемилюминесценции (RLU) на приборе VarioScan (США).

Инкубация антигенных везикул с клетками Jurkat. Линия репортерных клеток Jurkat-NFAT-Lucia (Invivogen, Франция) с помощью лентивирусной трансдукции была модифицирована CD19-CAR или IL13-CAR. Для анализа активации 5×10^4 репортерных клеток Jurkat CAR-T смешивали со свежесыведенными антиген-положительными или пег-AV в соотношениях CAR T-клеток к AV (0, 4: 1, 2: 1, 1: 1, 1: 2, 1: 5, 1:10 или 1:20) в 96-луночном планшете и инкубировали в течение 24 часов при 37°C. Супернатант отделяли от клеток центрифугированием (4 °C, 300 g, 5 мин) и переносили в непрозрачный 96-луночный планшет. Активацию репортерных клеток Jurkat-NFAT-Lucia CAR-T измеряли по уровню активности люциферазы при добавлении люциферина Quanti-luc Gold (Invivogen, Франция).

2.6.6. Анализ уровня дегрануляции T-клеток

CAR T-клетки ресуспендировали в среде TechMACS (США) в концентрации 2×10^6 клеток/мл. 100 мкл клеточной суспензии переносили в 96-луночный планшет и добавляли 2 мкл антитела против CD107a человека (BD, США). CAR-T-клетки смешивали с антиген-положительными или пег-AV в соотношении 1:1 или оставляли без обработки (контроль) и

инкубировали в течение 2 часов при 4°C. Суспензию клеток дважды промывали средой TexMACS (4°C, 300 г, 5 мин), окрашивали антителами против CD3/CD4/CD8 человека. Уровень дегрануляции анализировали методом проточной цитофлуориметрии.

2.6.7. Выделение мРНК и Nanostring анализ

Для анализа уровня экспрессии мРНК в CAR T-клетках был использован набор CAR-T Expression Panel (NCounter, США). Для получения популяции, состоящей исключительно из модифицированных клеток CD19-CAR T-клетки сортировали на приборе SH800 Cell Sorter (Sony, Япония). Далее 3×10^5 клеток смешивали с EV (на 1 CAR T-клетку приходилось 25×10^3 EV) и инкубировали в течение 24 часов. По истечении времени клетки промывали 2 раза раствором PBS и лизировали в 1 мл TRIzol reagent (Qiagen, Германия). К раствору добавляли 200 мкл хлороформа, перемешивали 20-30 секунд и центрифугировали 15 минут при 12000 об/мин на 4°C. Водную фазу переносили в пробирку, содержащую 600 мкл холодного изопропанола. Раствор аккуратно перемешивали переворачиванием пробирки и инкубировали 10 мин на комнатной температуре. Далее пробирки центрифугировали 12000 об/мин 15 мин 4°C, удаляли супернатант, осадок дважды промывали 1000 мкл холодного 70% этанола с промежуточным этапом центрифугирования (12000 rpm 15 мин 4°C). Осадок сушили на 60°C в течении 10 мин, ресуспендировали в 10 мкл mQ свободной от РНКаз и измеряли концентрацию полученной РНК на спектрофотометре NanoDrop (США). В реакцию гибридизации брали РНК в концентрациях от 70 до 300 ng/mkl. Анализ проводили с помощью прибора nCounter согласно рекомендациям производителя. Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения nSolver Analysis Software в Advanced режиме.

2.6.8. Изучение пролиферативной активности CAR T-клеток

На 4 день после трансдукции 2×10^6 CD19-CAR T-клеток помещали в среду без добавления IL-2 и инкубировали в течение 48 часов. Далее мембрану клеток метили 1 мкл реагента CellTrace CFSE (Invitrogen, США) в течение 5 минут при 37°C и дважды промывали PBS. 5×10^5 CFSE-меченных CAR T-клеток смешивали со свежесыведенными CD19-AV и peg-AV в соотношении 1:1. В качестве положительного контроля клетки CAR-T, меченные CFSE, культивировали в присутствии 30 ед/мл IL-2. Клетки культивировали

до 1 недели, культуральную среду заменяли свежей средой, содержащей AV (такое же количество, как в начале инкубации) каждые 48 часов. На 4 день совместной инкубации клетки окрашивали антителами против CD19 человека FITC (Acro Biosystems, США), APC против CD4 человека (Biolegend, Великобритания) и PE антителами против CD8 человека (Biolegend, Великобритания) и анализировали пролиферацию клеток методом проточной цитофлуориметрии.

2.6.9. Анализ истощения и дифференциации CAR Т-клеток под действием AV

На 4 день после трансдукции, 1×10^6 CD19-CAR Т-клеток стимулировали различными активирующими агентами:

- CD3/CD28 Dynabeads (Thermo Scientific, США) в присутствии 30 Ед/мл IL-2
- 30 Ед/мл IL-2
- 2×10^5 CD19-AV
- 2×10^5 HeLa CD19 клеток

Стимулированные клетки культивировали в течение 14 дней (37°C, 5% CO₂) с поддержанием концентрации клеток не превышающей $2,5 \times 10^6$ / мл. Каждые 48 часов добавляли свежие CD19-AV. На 2, 4, 7 и 14 дни клетки подсчитывали и определяли кратное увеличение путем деления количества клеток в разные моменты времени на количество клеток в начале эксперимента. На 4, 7 и 14 дни клетки также окрашивали антителами CD19-Fc FITC (R&D Systems, США), CD4 APC (Biolegend, Великобритания) и CD8-PE (Biolegend, Великобритания), CD45RA-PE (Biolegend, Великобритания), CD62L-APC (Biolegend, Великобритания), CD57-PE-Cy7 (Miltenyi, США), TIGIT-PE-Cy7 (Miltenyi, США) и PD-1-APC (Miltenyi, США) и анализировали статус дифференцировки и истощения CAR-Т-клеток.

2.6.10. Анализ концентрации ДНКазы I

Концентрацию ДНКазы I в среде для культивирования клеток и образцах плазмы анализировали с помощью флуоресцентного зонда, представляющего шпильку олигонуклеотида, меченного флуоресцентным красителем и гасителем. Увеличение флуоресценции контролировали с помощью планшетного ридера Varioscan Flash (Thermo Scientific, США). Культуральную среду и образцы плазмы в 20 раз разводили реакционным буфером. В реакции использовали флуоресцентный зонд в концентрации 0,25 мкМ.

Калибровочная кривая оценки концентрации ДНКазы I была получена с использованием разведений рекомбинантной ДНКазы I (Pulmozyme®, Dornase alfa) (Genentech, Южный Сан-Франциско, Калифорния, США) при условии, что ее концентрация составляет 1 мг/мл и Mw 31 кДа в соответствии с данными поставщика.

2.7. Работа с животными

2.7.1. Получение опухолевых клеток, экспрессирующих ген люциферазы

Опухолевые клетки MC38 и Nalm-6, экспрессирующие гены GFP и люциферазы светлячка (ffLuc), получали методом лентивирусной трансдукции FLuc-F2A-GFP-IRES-Nygro (Biosettia, Сан-Диего, Калифорния, США), затем отбирали с помощью 200 мкм/мл гигромицина (Thermo Fisher Scientific, США). Для визуализации мышей с подсаженными опухолями их анестезировали ингаляционным изофлураном с последующей внутрибрюшинной инъекцией D-люциферина (GoldBio, США). Через 10 мин, чтобы обеспечить распределение люциферина, мышей визуализировали с помощью системы оптической визуализации IVIS Lumina II (PerkinElmer Inc., Шанхай, Китай) в соответствии с инструкциями производителя. Анализ полученных данных проводили с использованием программного обеспечения для живых изображений (PerkinElmer Inc., Шанхай, Китай). Интересующие области были выбраны вручную и количественно определены для среднего потока фотонов (фотоны / секунда / см² / стерадиан).

2.7.2. Работа с мышами NSG

Животные содержались в специальных, свободных от патогенов условиях в Пущинском животноводческом комплексе БИБЧ РАН (биоресурсный сборник «Коллекция лабораторных грызунов категории SPF для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований»). Для экспериментов использовали самок и самцов мышей NSG (NOD/SCID/IL2γnull) в возрасте от шести до восьми недель со средним весом от 16 до 20 г. Мышам вводили 1×10⁶ клеток Nalm-6 pCDH-ffLuc в 100 мкл PBS в хвостовую вену. При развитии опухоли, мышей распределяли в экспериментальную и контрольную группы. На 5 день после введения опухоли животным внутривенно вводили 2×10⁶ CD19-CAR T клеток, обработанных CD19-AV, стимулированных IL-2, либо контрольные T-клетки. Динамику роста опухоли контролировали каждые 4 дня с использованием системы

визуализации IVIS Spectrum In vivo (PerkinElmer, Китай) после внутривенной инъекции D-люциферина (GoldBio, США).

2.7.3. Работа с мышами линии C57BL/6

Самцы и самки мышей дикого типа (C57BL/6) были приобретены в Jackson Laboratories (Бар-Харбор, Мэн, США). Протоколы для животных были одобрены комитетом по уходу за животными и их использованию Университета штата Огайо, и эксперименты проводились в соответствии с рекомендациями Национального института здравоохранения. Для создания модели метастазов печени мышей под наркозом помещали в положение лежа на спине и после дезинфекции кожи в зоне операции был выполнен средний разрез брюшной полости с последующей мобилизацией двенадцатиперстной кишки для идентификации воротной вены. Один миллион клеток MC38 вводили в воротную вену с помощью иглы 30-G. После удаления иглы кровотечение останавливали, осторожно нажимая на место прокола ватным тампоном. После инъекции кишечник был перемещен, а брюшная стенка ушита нерассасывающимися швами. Дозу $1,05 \times 10^{12}$ вирусных копий на мышью систематически вводили через хвостовую вену через 4 дня после инъекции MC38. У животных собирали образцы крови до и через 21 день после инъекции MC38. Анализ печени проводили через 21 день после инъекции MC38.

2.7.4. Иммуногистохимия

Для проведения иммуногистохимического анализа опухоли мышей резецировали и фиксировали в формалине. Слайды депарафинизировали и регидратировали два раза в ксилоле в течение 5 минут, два раза в 100% этаноле в течение 5 минут, два раза в 95% этаноле в течение 1 минуты, затем 5 минут в проточной H₂O. Для демаскировки антигена срезы нагревали с использованием микроволновой печи (Vector Laboratories, Burlingame, CA, США). После подавления эндогенных пероксидаз, предметные стекла блокировали в 10% козьей сыворотке (Vector Laboratories, Россия) в течение 1 часа при 25°C. Срезы инкубировали с первичными антителами против CD45 (1: 500 в течение ночи при 4°C) (BD PharmagIn, Сан-Диего, Калифорния, США), CD4 и CD8 (1: 500 в течение ночи при 4°C) (Abcam, Великобритания.). После трех промывок в PBS слайды инкубировали со вторичным антителом в течение 45 минут при 25°C. Далее слайды контрастировали гематоксилином. Для постановки отрицательного контроля срезы инкубировали только с

вторичными антителами. Далее определяли процент клеток, окрашенных положительно в 10 случайных областях срезов при увеличении $\times 400$ под световой микроскопией.

2.7.5. Статистический анализ

Статистический анализ выполняли с помощью GraphPad Prism 8.0 (GraphPad). Легенда каждого рисунка обозначает используемый статистический тест. Средние значения отображаются в виде столбцов ошибок со стандартным отклонением. Дисперсионный анализ ANOVA применяли с использованием теста множественных сравнений Тьюки. Для всех рисунков - * означает $P < 0,033$, ** означает $P < 0,002$, *** означает $P < 0,001$, **** означает $P < 0,0001$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Введение (влияние факторов микроокружения на CAR T-клетки и эффективность CAR-T терапии)

Литературный обзор данной диссертационной работы содержит компиляцию современных представлений и данных, подтверждающих, что при онкологических патологиях Т-клетки подвержены, как правило, негативному влиянию факторов опухолевого микроокружения. Несмотря на очевидные успехи в изучении этих факторов, их действие на терапевтические Т-клетки, применяемые для адоптивной противоопухолевой Т-клеточной терапии охарактеризовано пока недостаточно полно. Важность исследований в этом направлении безусловна, поскольку на сегодняшний день отсутствует надежная CAR-T терапия резистентных форм солидных опухолей, а отсутствие результата при CAR-T терапии гематологических онкологических заболеваний может быть связано именно с негативными факторами микроокружения. К этим факторам относят, в том числе, внеклеточные везикулы, выделяемые клетками опухоли, а также NET – внеклеточные ловушки, выбрасываемые активированными нейтрофилами и являющиеся физическим барьером на пути опухолеспецифичных лимфоцитов. В нашей работе была поставлена цель исследовать влияние опухолевых везикул на CAR T-клетки в случае В-клеточной лимфомы, а также оценить эффект от введения ДНКазы I на рост опухоли с целью использования этого фермента для увеличения эффективности CAR-T терапии. Кроме того, нами была создана новая технология получения искусственных антигенных везикул, которые можно применять для увеличения терапевтического потенциала и ускорения экспансии CAR T-клеток.

Для достижения поставленных целей нами был создан ряд экспериментальных моделей и оригинальных методик, которые были успешно применены для изучения механизмов межклеточных взаимодействий, а также влияния микровезикул на цитолитическую активность и персистенцию функциональных CAR T-клеток. В частности, были получены новые репортерные линии, несущие гены флуоресцентных белков или секретруемого варианта люциферазы, а также создана модель ксенотрансплантации человеческой лимфомы на линии мышей NSG с целью оценки противоопухолевой активности CAR T-клеток.

3.2. Изучение влияния экзосом EV на противоопухолевую активность CAR T-клеток

В настоящий момент в литературе отсутствует описание прямых экспериментов и данных о влиянии внеклеточных опухолевых везикул, несущих поверхностный антиген, на CAR T-клетки. Между тем, опубликованы результаты исследований, свидетельствующие, что в мышинных моделях опухолевые везикулы негативно влияют на активность T-клеток, особенно на цитотоксический потенциал CD8⁺ T-клеток. Поэтому было решено исследовать взаимодействие CAR T-клеток с опухолевыми везикулами, на поверхности которых присутствует мишень CAR, а также оценить влияние везикул на фенотип и функцию CAR T-клеток *in vitro*. Объектом исследования стали пары CD19-CAR/CD19 и IL13-CAR/IL13R2a, поскольку они достаточно хорошо изучены, известны способы получения CD19- и IL13-CAR T-клеток с помощью трансдукции лентивирусными конструкциями, хорошо охарактеризованы клетки-мишени Nalm-6, и клетки линий глиомы, которые продуцируют везикулы с поверхностными маркерами CD19 и IL13R2a, соответственно. В начале работы мы предусмотрели создание репортерных линий, необходимых для оценки влияния везикул на CAR-T, продукции опухолевых везикул, содержащих флуоресцентные белки и люциферазу с CD19, а также контрольных клеток, не несущих CD19. Кроме этого были оптимизированы методы получения CD19- и IL13- CAR-T из лимфоцитов крови здоровых доноров, а также методы выделения и характеристики внеклеточных везикул.

3.2.1. Получение клеточной линии Nalm-6, нокаутированной по CD19 антигену

Для получения опухолевых везикул, которые можно использовать в качестве адекватного отрицательного контроля, было предложено использовать модифицированную линию лимфомы Nalm-6, которая не синтезирует CD19. Соответственно, такие клетки, не отличаясь по другим компонентам от нормальных Nalm-6, должны выделять внеклеточные везикулы (далее EV) без CD19 на поверхности. Это важно, поскольку позволяет сразу решить вопрос специфичности связывания, которая, согласно предложенной нами гипотезе, должна зависеть от связывания CAR с антигеном. Для решения данной задачи было решено использовать технологию CRISPR/Cas9 (142), позволяющую с помощью введения в клетку нуклеазы Cas9 и предварительно подобранных гайдовых РНК, внести в нужное место геномного локуса CD19 разрывы, которые после их репарации должны

привести к потере кодирующей белок части гена CD19 (Рис. 8). Места разрывов были подобраны так, чтобы вносимая делеция привела к потере части гена, и как следствие, потере синтеза белка CD19. К 5'-концевой части гена CD19 человека с помощью приложения CRISPOR были подобраны две гайдовые РНК (143).

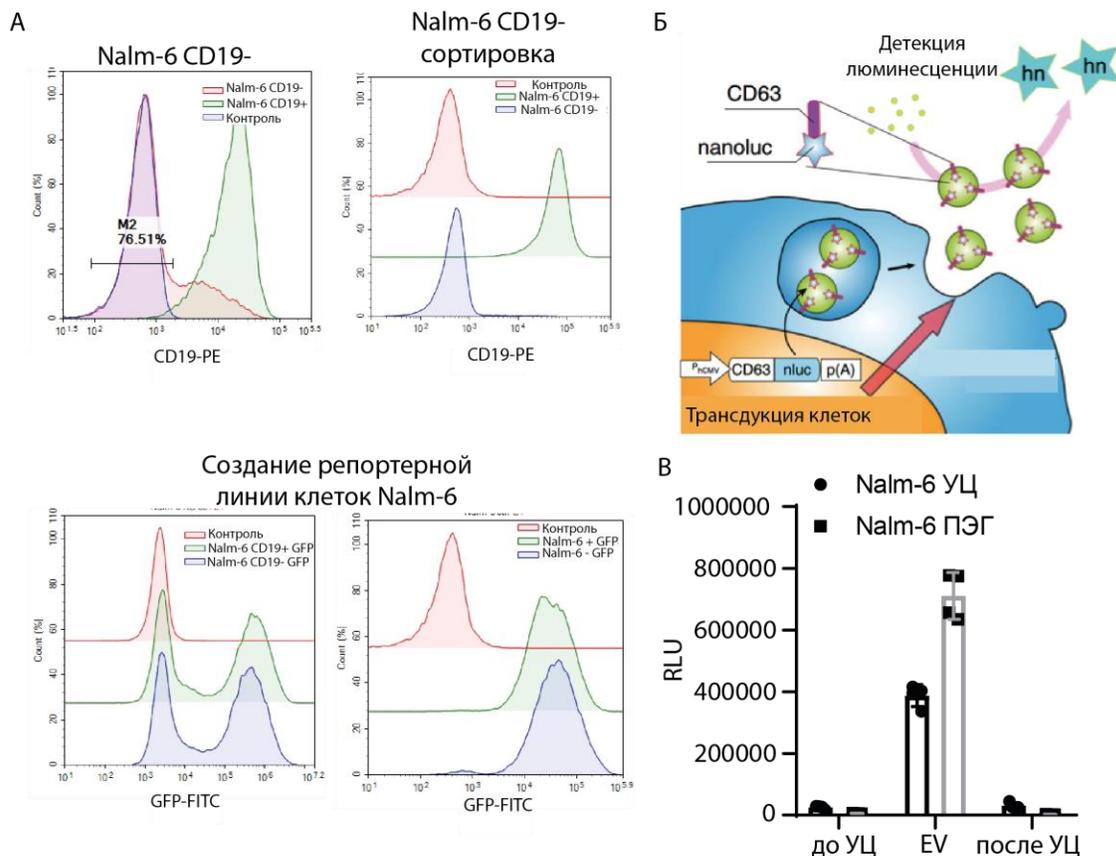


Рисунок 8. Создание репортерных клеток на основе линии Nalm-6 для получения меченых внеклеточных экзосом. А – получение нокаутной по CD19 линии клеток, оценка уровня нокаута методом проточной цитометрии; создание на основе линий Nalm-6 CD19⁺ и Nalm-6 CD19⁻ линий продуцентов экзосом в репортерными генами CD63-nanoluc и CD63-GFP. Б – схематическое изображение репортерной системы на основе гена CD63-nanoluc. В – Получение EV, несущих репортерный белок nanoluc, слитый с CD63, и характеристика везикул по уровню хемилюминесценции (RLU) нанолуциферазы до (супернатант до УЦ/ПЭГ) и после (супернатант после УЦ/ПЭГ) выделения методами ультрацентрифугирования или осаждения PEG (полиэтиленгликолем) в составе Total Exosome Isolation reagent.

В критерии подбора РНК было заложено, что они должны быть комплементарны ДНК-мишени непосредственно после РАМ-региона и обладать минимальной

способностью вызывать нецелевую нуклеазную активность в отношении других частей генома (off-target). Для получения коротких гайдовых РНК использовали обратную транскрипцию, которую проводили на ДНК-матрице, полученной с помощью ПЦР. Полученную РНК очищали из реакционной смеси и смешивали с нуклеазой Cas9 для электропорации клеток РНК-белковыми комплексами. Уровень нокаута гена оценивали через 5 дней после электропорации путем окрашивания суспензии клеток антителами к CD19 с последующим анализом методом проточной цитофлуориметрии. Обогащение популяции нокаутированных клеток проводили с помощью сортировки дефицитных по CD19 клеток. В результате была получена линия клеток лимфомы Nalm-6, лишенная поверхностного маркера CD19 (Nalm-6 CD19⁻, Рис. 8,А).

3.2.2. Получение репортерных линий клеток, продуцирующих маркированные рекомбинантными белками EV, и выделение меченых везикул из культуральных супернатантов

Поскольку, по определению, внеклеточные везикулы/экзосомы имеют небольшие линейные размеры (50-250 нм в диаметре), их визуализация представляет собой непростую техническую проблему. В отличие от клеток, неокрашенные EV практически невозможно детектировать методом проточной цитофлуориметрии. Однако, путем создания репортерных линий клеток, которые продуцируют везикулы, маркированные флуоресцентными белками, их гораздо проще идентифицировать оптическими методами. Для решения этой задачи в лентивирусный вектор клонировали кДНК тетраспанина CD63 (мажорный белок внешней поверхности везикул), который синтезировался в виде одной полипептидной цепи с нанолюциферазой (плазмидный вектор pCDH115-CD63-nanoluc), либо с зеленым флуоресцентным белком eGFP (вектор pLV2-CD63-GFP). В результате стабильной трансдукции клеток такими конструкциями, стало возможно либо детектировать выделяющиеся в среду везикулы по флуоресценции eGFP, либо количественно оценивать содержание везикул и их связывание с клетками мишенями, измеряя люминесценцию, вызванную окислением субстрата под действием люциферазы (Рис. 9,В). Разработанный подход позволяет существенно упростить визуализацию везикул, а кроме того, перевести эксперименты из категории качественных в количественные (в случае измерения активности люциферазы). Соответствующие лентивирусные частицы использовали для получения репортерных клеток на основе линий Nalm-6 и Nalm-6 CD19⁻,

которые стабильно продуцировали белки CD63-nanoluc или CD63-GFP (Рис. 8,А). Конструкция на основе вектора pCDH115, кроме гена CD63-nanoluc, несет ген флуоресцентного белка eGFP под CMV промотором, что позволяет отбирать светящиеся eGFP клетки, которые также синтезируют CD63-nanoluc (144).

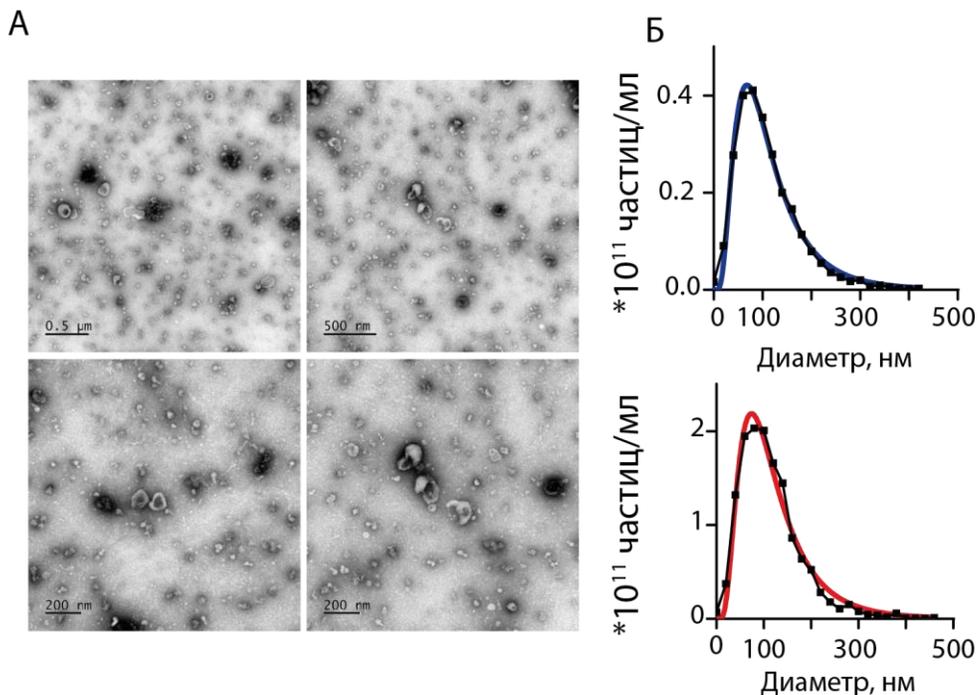


Рисунок 9. Количественная и качественная характеристика экзосом, выделенных из клеток Nalm-6. А – Изображения экзосом, полученные методом ТЭМ. Б - NTA анализ распределения частиц по размерам и концентрация изолированных EV. Верхний график соответствует распределению экзосом, выделенных из клеток, нокаутных по CD19 (Nalm-6 CD19⁻), нижний Nalm-6 CD19⁺, соответственно.

Маркированные рекомбинантными белками экзосомы выделяли из супернатантов культур репортерных линий и характеризовали с помощью количественных и качественных методов (Рис. 9). Один из них - это трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ), которая позволила увидеть отдельные экзосомы (отмечены стрелками) в образцах, полученных из Nalm-6, и оценить размеры экзосом, которые составили примерно 50-200 нм, что соответствует литературным данным (Рис. 9,А) (99,145). Поскольку EV из клеток линий Nalm-6 CD63-nanoluc должны содержать люциферазу, относительное количество везикул в препаратах можно определить, измерив

Внеклеточные везикулы, выделенные из культур клеток лимфомы Nalm-6, по сути, должны нести на поверхности набор белков, представленных на мембране В-клеток лимфобластного лейкоза. Для характеристики поверхностного фенотипа везикул мы частично определили состав белков, представленных на поверхности EV (Рис. 10). Препарат везикул был окрашен с помощью набора MACSPlex Exosome Kit (Miltenyi Biotec), а затем, окрашенные препараты, были проанализировали с помощью прибора MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec). Данная мультиплексная технология позволяет одновременно детектировать 37 поверхностных маркеров на мембранах выделенных экзосом. Таким образом, нами были охарактеризованы экзосомы, выделенные из клеток Nalm-6 и Raji, и показано, что они несут характеристические белки экзосом - тетраспанины (CD9, CD81 и CD63) и маркер В-клеток CD19. Кроме этого, на поверхности везикул присутствует также маркер В-клеток CD24, несколько форм интегринов, и молекулы МНС (Рис. 10).

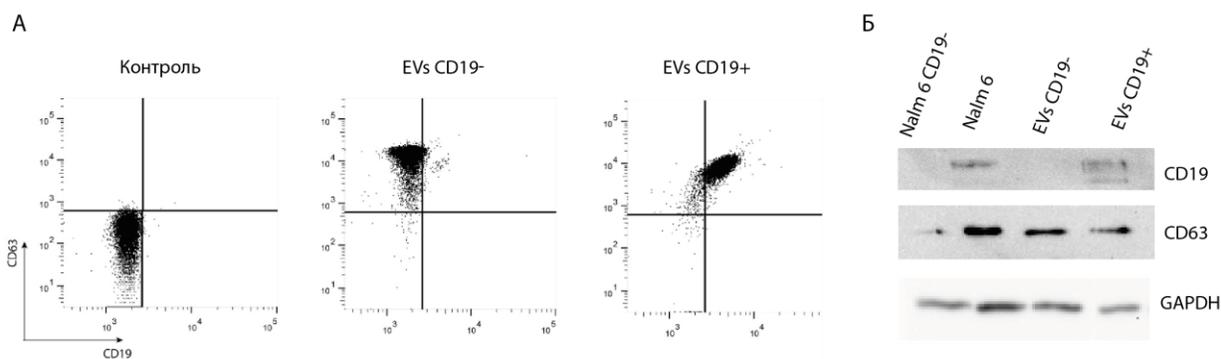


Рисунок 11. Оценка уровня экспрессии CD19 и CD63 маркеров на поверхности экзосом, полученных из клеточных линий Nalm-6 CD19⁺ и Nalm-6 CD19⁻. Результаты получены методами проточной цитометрии (рисунок слева) окрашивание на CD63 и CD19 маркеры и методом Вестерн-блот (рисунок справа).

Для независимого подтверждения наличия интересующего нас маркера CD19 на поверхности экзосом Nalm-6 CD19⁺ и его отсутствия на экзосомах Nalm-6 CD19⁻, супернатанты препаратов, полученные методом УЦ, проинкубировали с полимерными шариками, несущими на поверхности антитела к CD81 для специфической сорбции EV. Прикрепившиеся к шарикам EV инкубировали в виде суспензии с моноклональными флуоресцентно мечеными антителами к CD19, а затем анализировали с помощью

проточной цитофлуориметрии. Помимо этого, лизаты сорбированных на шариках везикул анализировали методом Вестерн-блот (Рис. 11). Полученные данные подтверждают, что CD19 присутствует на поверхности экзосом, полученных их клеточной линии Nalm-6 CD19⁺, и отсутствуют на Nalm-6 CD19⁻. При этом, CD63 и GAPDH детектировались во всех образцах, проанализированных с помощью метода Вестерн-блот, окрашенного антителами к этим белкам.

3.2.3. Создание Т клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами.

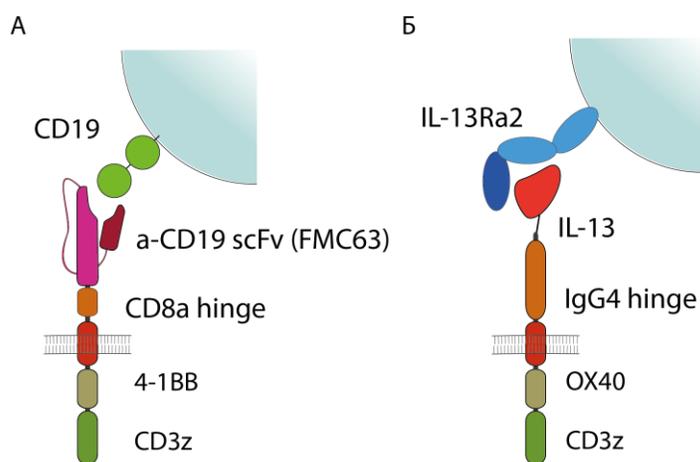


Рисунок 12. Схематическое изображение строения химерных антигенных рецепторов, узнающих CD19 (А) и IL-13Ra2(В) (конструкции pLV2-CD19-CAR и pLV2-IL13-CAR, соответственно).

В качестве мишеней для CAR Т-клеток были выбраны маркеры CD19 и IL13R2a, которые присутствуют на опухолевых клетках лимфом и глиом, соответственно. В конструкции CD19-CAR в качестве внеклеточной части рецептора, распознающей и связывающей мишень, был выбран фрагмент scFv anti-CD19 (клон FMC63) (147). В дизайне CD19-CAR использовали шарнирный фрагмент и трансмембранную часть белка CD8a, а также внутриклеточные домены молекул 4-1BB и CD3 ζ , отвечающие за передачу сигнала (Рис. 12,А). Для создания IL13-CAR в качестве внеклеточной части, узнающей и связывающей соответствующий рецептор IL13R2a, была выбрана мутантная форма цитокина ИЛ-13 (IL-13mut клон E13Y), которая вместе с константной частью антитела IgG4, (домен hinge, содержащий CH2-CH3 участки IgG4) представляет внеклеточную часть

конструкции CAR. Выбор такой конструкции позволяет проводить детекцию IL13-CAR при помощи антител, специфичных к константной части IgG4 (Рис. 12,Б). Сигнальная часть CAR представлена трансмембранным участком CD28 и внутриклеточной частью молекул OX-40 и CD3 ζ . Созданные лентивирусные векторные конструкции с генами CAR (pLV2-IL13-CAR и pLV2-CD19-CAR) были использованы для создания CAR-T из Т клеток, выделенных из здоровых доноров, или репортерных CAR клеток на основе клеточной линии Jurkat-Lucia NFAT (InvivoGen). Репортерная линия Jurkat-NFAT является опухолевой линией Т-лимфоцитов человека и содержит ген люциферазы, находящийся под индуцибельным промотором ISG54. Активация этого промотора происходит под действием белков NFAT (ядерных факторов активированных Т-клеток), синтез которых в CD4⁺ Т-клетках происходит при стимуляции Т-клеточного рецептора. Поскольку сигналы, передаваемые через CAR, в большой степени воспроизводят сигналы от Т-клеточного рецептора, линию Jurkat-NFAT, несущую CAR, можно использовать для количественной оценки активации CAR. Дело в том, что уровень продукции и ферментативная активность люциферазы, синтез которой контролируется NFAT-зависимым промотором, коррелируют с уровнем сигнала, передаваемого CAR. На Рисунке 13 представлен результат иммунофлуоресцентного окрашивания, где отчетливо видно, что подавляющее большинство полученных в результате сортировки клеток Jurkat-Lucia NFAT CAR-T синтезируют необходимые CAR (Рис. 13,А). Доля трансдуцированных Т-клеток составляла 32% и 37% для CD19-CAR и IL13-CAR, соответственно (Рис. 13,Б, В).

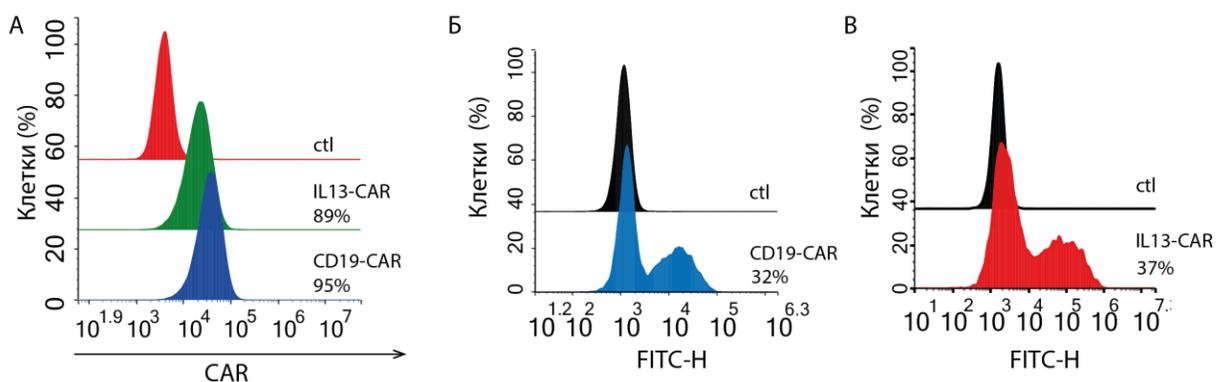


Рисунок 13. Анализ уровня экспрессии CAR на поверхности Т-клеток. А – клетки Jurkat, трансдуцированные CD19-CAR и IL13-CAR. В – Т клетки CD19-CAR, С – Т клетки IL13-CAR, соответственно, были проанализированы после трансфекции до сортировки.

3.2.4. Связывание опухолевых EV с CAR T-клетками.

На следующем этапе, для того чтобы выяснить влияют ли внеклеточные везикулы на функции CAR T-клеток, в первую очередь необходимо было установить факт связывания везикул с поверхностью CAR T-клеток, а также зависимость этого связывания от антигена-мишени. Для анализа связывания экзосом, полученных из линий лимфомы и глиомы, с клетками линии Jurkat CD19-CAR и Jurkat IL13-CAR использовали экзосомы, несущие ген CD63-nanoluc. Оценку связывания экзосом с CAR T-клетками проводили по уровню хемилюминесценции нанолоуциферазы, связывание везикул и клеток проводили двумя разными способами. В первом случае клетки, которые продуцировали EV (U87 для IL13R2a, либо Nalm-6 для CD19) были отделены от соответствующих CAR T-клеток мембраной с размером пор до 200 нм. В этом случае CAR T-клетки не могут физически контактировать с клетками-мишенями, но могут обмениваться растворимыми молекулами и внеклеточными везикулами, достаточно маленькими, чтобы проникать через мембрану (Рис. 14,А). Во втором эксперименте очищенный методом УЦ препарат EV добавляли к CAR T-клеткам (Рис. 14,Б). Из полученных данных представленных на Рисунке 14, по уровню люминесценции можно сделать вывод, что экзосомы уже в течение первых 10 минут инкубации при 37°C связываются (или поглощаются) клетками-реципиентами (CAR T-клетками), при этом, наблюдается избирательная аффинность EV Nalm-6 к CD19-CAR, а глиомных экзосом к IL13-CAR T-клеткам.

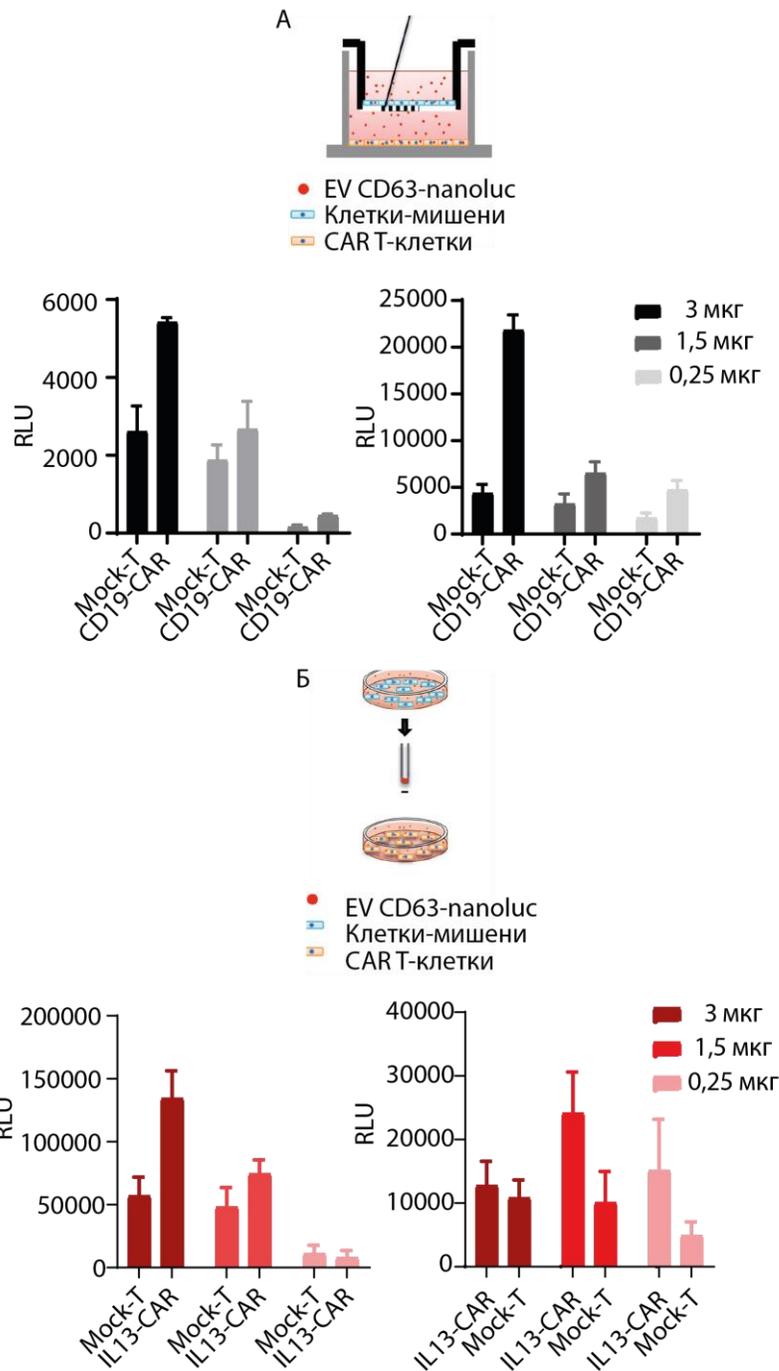


Рисунок 14. Экзосомы (EV), содержащие на поверхности CD19 и IL-13mut связывают CD19-CAR и IL13-CAR при инкубации продуцирующими их клетками Nalm-6 (CD19) и U87 (IL13Ra2) с соответствующими CAR T-клетками в эксперименте “transwell” (A) и при непосредственном контакте между CAR T-клетками и очищенными экзосомами (Б).

К сожалению, определение уровня люциферазной активности везикул не позволяет отличить частицы, поглощенные клетками от связанных и оставшихся на поверхности. Чтобы определить, происходит ли интернализация везикул CAR T-клетками или передача содержимого везикул клеткам-реципиентам, были получены конфокальные изображения CAR T-клеток, предварительно проинкубированных с EV. Для детекции T-клеток использовались антитела к CD3, а EV из клеток Nalm-6 детектировали антителами к CD19. Результаты микроскопии Jurkat CAR клеток представлены на Рисунке 15,А, где хорошо заметно избирательное связывание EV CD19⁺ и их поглощение только теми клетками, которые несут на поверхности CD19-CAR. Также были получены конфокальные изображения CAR T-клеток, полученных из клеток здорового донора. Для эксперимента CD19-CAR T-клетки инкубировали с EV, выделенными из немодифицированных клеток Nalm-6-CD63-eGFP (EV CD19⁺), либо контрольных Nalm-6-CD63-eGFP (EV CD19⁻). Результаты микроскопии представлены на рисунке 15,В, где по свечению eGFP, присутствующего на экзосомах, видно специфичное поглощение CD19-CAR T-клетками экзосом CD19⁺, но не CD19⁻.

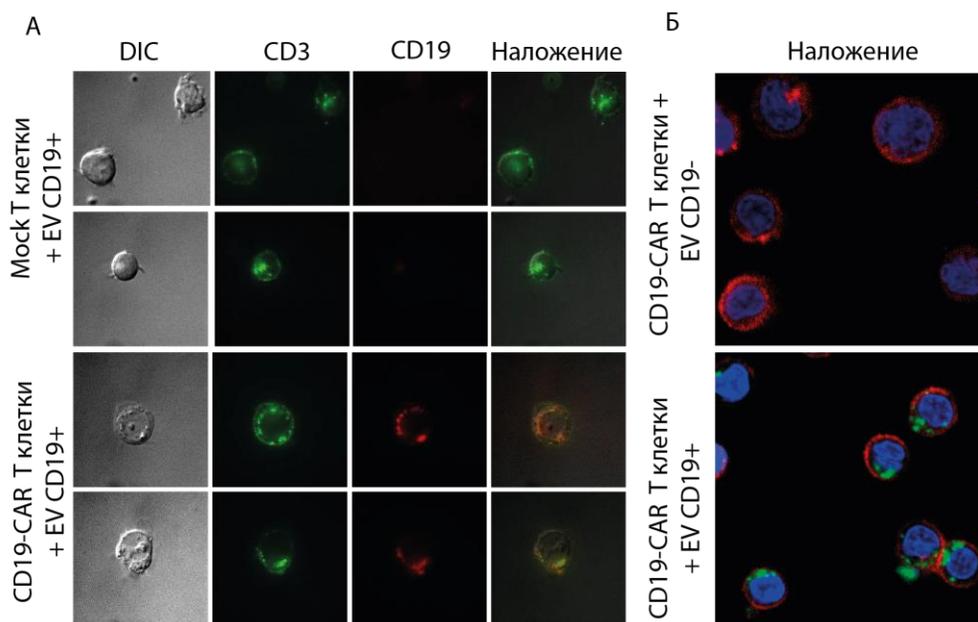


Рисунок 15. Конфокальное изображение CAR T-клеток, обработанных EV. А – Конфокальное изображение клеток Jurkat/Jurkat-CD19-CAR, инкубированных с CD19⁺ экзосомами. (красный - CD19, зеленый – CD3) Б – CD19-CAR T-клетки инкубировали с CD19⁺ EV и CD19-EV (красный - CD3, зеленый – CD63-GFP, синий – ядро (Hoechst33342)).

3.2.5. Влияние EV на функциональную активность CAR T-клеток

Взаимодействие CAR T-клетки с антигеном-мишенью приводит к стимуляции, которая активирует CAR T-клетку. Активация инициирует пролиферацию, которая сопровождается секрецией провоспалительных цитокинов (IFN γ и IL-2). Это событие является предпосылкой цитотоксичности и непосредственно определяет эффекторную функцию CAR T-клеток. Следовательно, чтобы охарактеризовать индукцию эффекторной функции CAR T-клеток с помощью экзосом, методом ИФА (иммуноферментный анализ) были проанализированы супернатанты, культур CD19-CAR T-клеток, проинкубированных с EV Nalm-6 CD19⁺ и Nalm-6 CD19⁻. Данный метод позволяет количественно оценить уровень секреции провоспалительных цитокинов IFN γ и IL-2 после стимуляции CAR T-клеток. Было обнаружено, что только экзосомы, содержащие CD19, вызывают продукцию провоспалительных цитокинов CD19-CAR T-клетками, что свидетельствует об их активации (Рис. 16,А).

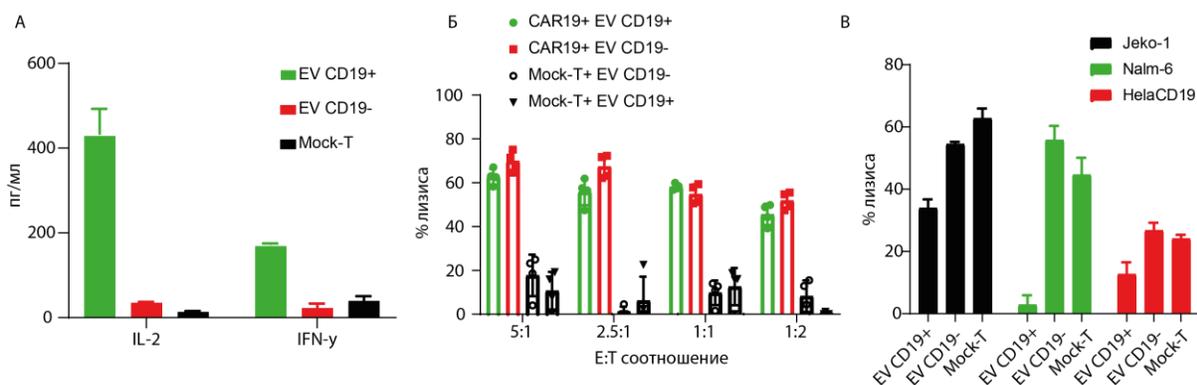


Рисунок 16. Анализ изменения функциональной активности CAR T-клеток под действием EV. А - Анализ секреции провоспалительных цитокинов при инкубации CD19-CAR T-клеток с CD19⁺ экзосомами (EV CD19⁺) или с CD19⁻ экзосомами (EV CD19⁻), (Mock-T) – анализ базового уровня провоспалительных цитокинов. Б - Анализ 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.

Продукция цитокинов также может быть предпосылкой изменения цитотоксической активности CAR T-клеток, которая заключается в секреции гранзимов и перфорина, которые необходимы для лизиса клеток-мишеней. Для анализа цитотоксичности CAR T-

клеток использовали набор реагентов, который позволяет колориметрическим методом детектировать уровень цитозольного белка лактатдегидрогеназы (ЛДГ), который высвобождается из клеток, подвергшихся лизису. В качестве отрицательного контроля использовались не модифицированные CAR T-клетки (Mock-T) (Рис. 16,Б). Спустя 10 часов после добавления EV наблюдается заметное различие в цитотоксичности CD19-CAR клеток в отношении различных мишеней – CAR T-клетки, обработанные CD19⁺ экзосомами, проявляют сниженную цитотоксическую активность (Рис. 16,В). Данный эффект можно связать с ранней активацией CAR T-клетки в ответ на присутствующий на EV антиген еще до встречи с клетками-мишенями. Однако предварительная инкубация CD19-CAR T-клеток с CD19⁺ экзосомами в течении 24 часов приводит к незначительному снижению цитотоксической активности CAR T-клеток по сравнению с контролем, что может быть связано с рециркуляцией химерного антигенного рецептора и быстрого поглощения EV CAR T-клеткой (Рис. 16,Б).

Анализ цитотоксичности не позволяет в полной мере оценить те небольшие изменения, которые происходят с CAR T-клеткой под действием экзосом. Поэтому, для более детальной характеристики изменения эффекторной функции при поглощении EV клеткой, нами был использован метод транскриптомного анализа CAR T-клеток, обработанных EV. Данный метод (NanoString nCounter Gene Expression Assay) основан на прямом цифровом обнаружении интересующих молекул мРНК с использованием целевых пар зондов с цветовой кодировкой. Он позволяет определить уровень экспрессии до 800 генов за одну реакцию с высокой чувствительностью и точностью. Основываясь на полученных транскриптомных данных, мы установили, что происходит глобальное увеличение кластера генов, которые ответственны за активацию T-клеток (Рис. 17).

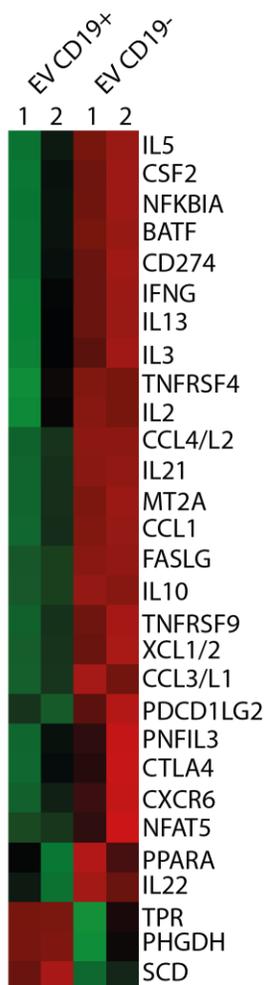


Рисунок 17. Транскриптомный анализ CD19-CAR T клеток, выделенных из двух доноров (1 и 2), обогащенных CD19-CAR T-клетками и проинкубированных с CD19⁺EV и CD19⁻EV. Данные представлены в виде тепловой карты и отображают изменение экспрессии мРНК, выделенной из CAR T-клеток. На тепловой карте представлены гены с достоверным различием изменения экспрессии ($p < 0.05$).

Примечательно, 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*. По-видимому, CD19, находящийся на поверхности EV промотирует активацию CAR T-клеток, что, вероятно, способствует тому, что неизвестные нам компоненты опухолевых экзосом потенциально могут инициировать функциональное истощение и гибель CAR T-клеток.

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

Везикулы, секретируемые опухолевыми клетками, несущие опухолевый антиген оказали способны специфически взаимодействовать и активировать CAR T-клетки. Такие свойства неклеточных структур могут быть крайне востребованы для получения и экспансии CAR T-клеток. Так как выделение EV является крайне трудоемкой задачей нами был разработан метод получения искусственных везикул (artificial vesicles, AV).

Экспансия антиген-специфических популяций T-клеток является важным и трудозатратным этапом получения терапевтических CAR T-клеток. При терапии CAR T-клетками, относительно небольшое количество донорских CAR T-клеток необходимо

размножить *ex vivo* в течение короткого времени до количеств, достаточных для эффективного противоопухолевого ответа *in vivo*. Контроль роста CAR-отрицательных Т-клеток в биомедицинском клеточном продукте становится ещё более важным в случае современных, более безопасных, но малоэффективных невирусных способов доставки CAR с помощью транспозонов. Во время процесса экспансии CAR Т-клеток необходима тщательная оценка доли антиген-специфических CAR Т-клеток, а также их функционального состояния, которое коррелирует с терапевтической эффективностью. Мы предположили, что линии immortalized или трансформированных клеток, экспонирующие опухолевые маркеры на поверхности, можно использовать для получения искусственных везикул, несущих опухолевые антигены CAR. Такие антигенные везикулы, возможно, получится использовать для *ex vivo* стимуляции CAR Т-клеток, что позволит преодолеть описанные выше проблемы при создании CAR Т-клеточного продукта. По определению, AV должны стимулировать только антиген-специфические Т-клетки, тем самым устраняя проблему размножения балластных нетрансдуцированных Т-клеток, а также генерировать CAR Т-клетки с более выраженным терапевтическим потенциалом.

3.3.1. Получение и характеристика искусственных антигенных везикул (AV)

Для получения AV была разработана методика, основанная на обработке клеток цитохалазином В (148) (Рис. 18), который разрушает актиновый цитоскелет, что приводит к экструзии ядра, отслоению плазматической мембраны и отпочковыванию мембранных микроцитосфер (149–151). Эти микроцитосферы можно отделить от клеток встряхиванием суспензии клеток. Содержащиеся в образующейся суспензии пузырьки (микроцитосферы), должны нести на поверхности белки, которые представлены на мембране «родительских» клеток (149).

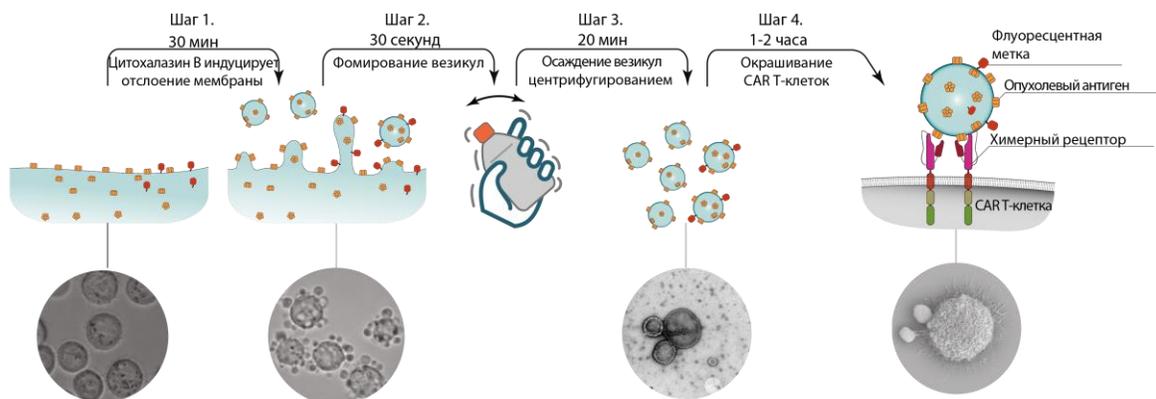


Рисунок 18. Схематическое изображение процесса получения искусственных везикул обработкой клеток HeLa цитохалазином В.

Для создания AV, содержащих антигены CAR, использовали линии клеток HeLa, которые предварительно трансдуцировали с целью продукции опухолеассоциированных маркеров (CD33, CD123, CD19, IL13R2a, Her2). кДНК онкомаркеров были получены из соответствующих опухолевых линий путем выделения тотальной РНК, преобразования РНК в кДНК методом обратной транскрипции и ПЦР-амплификации кДНК. Лентивирусные конструкции, кодирующие данные гены, были созданы на основе вектора рLV2 и использованы для стабильной трансдукции клеток HeLa. Присутствие опухолевых антигенов на клетках HeLa и на поверхности везикул подтвердили путем окрашивания антителами с последующим анализом методом проточной цитофлуориметрии (Рис. 19).

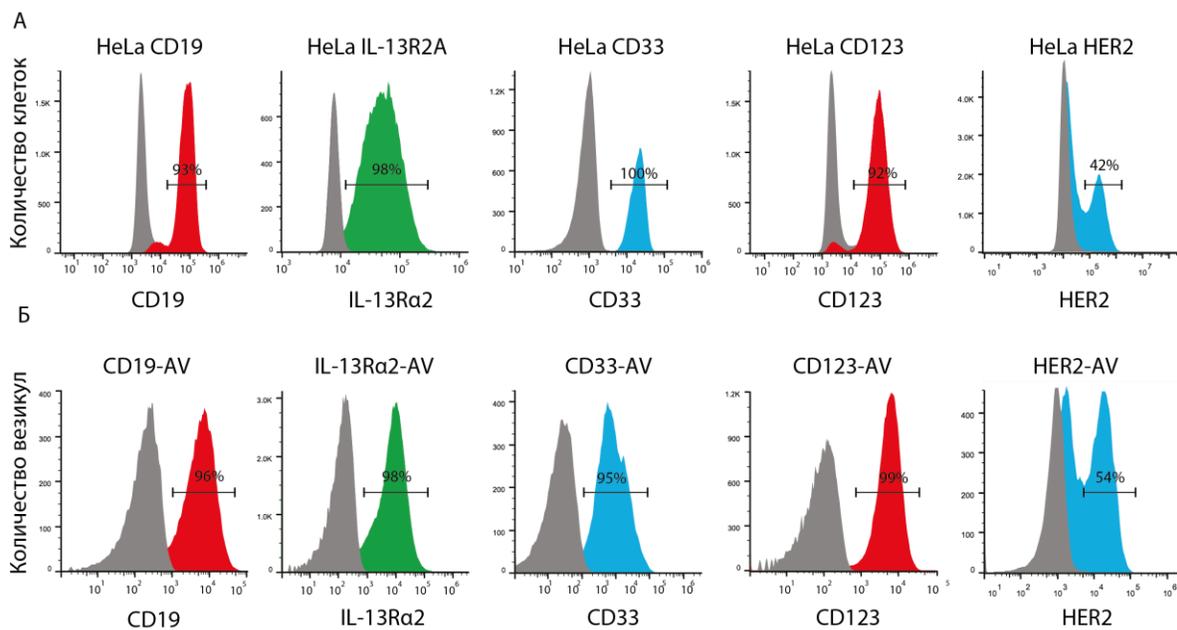


Рисунок 19. Получение панели клеточных линии HeLa несущих опухоль-ассоциированные антигены, с последующим получением искусственных везикул. На графике представлены результаты окрашивания клеточных линий HeLa и AV (А и Б, соответственно), антителами к целевым поверхностным антигенам. Серые гистограммы - отрицательные контроли. Линиями отмечены проценты клеток и AV, содержащих антигены.

Для флуоресцентного маркирования искусственных везикул полученные стабильные клеточные линии были трансдуцированы геном флуоресцентного белка dTomato (152) с трансмембранным якорем (dTomato-МТА). Флуоресцентные AV можно легко детектировать методом конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. Каждый этап процесса получения везикул визуализировали методом конфокальной микроскопии – на изображениях видно отслаивание цитоплазматической мембраны с образованием микроцитосфер, которые отделяли от разрушенных клеток и их фрагментов с помощью ступенчатого центрифугирования (Рис. 20,А). Далее с помощью ТЭМ подтвердили, что изображения AV похожи на представленные в литературе изображения относительно больших искусственных пузырьков (Рис. 20,Б) (148).

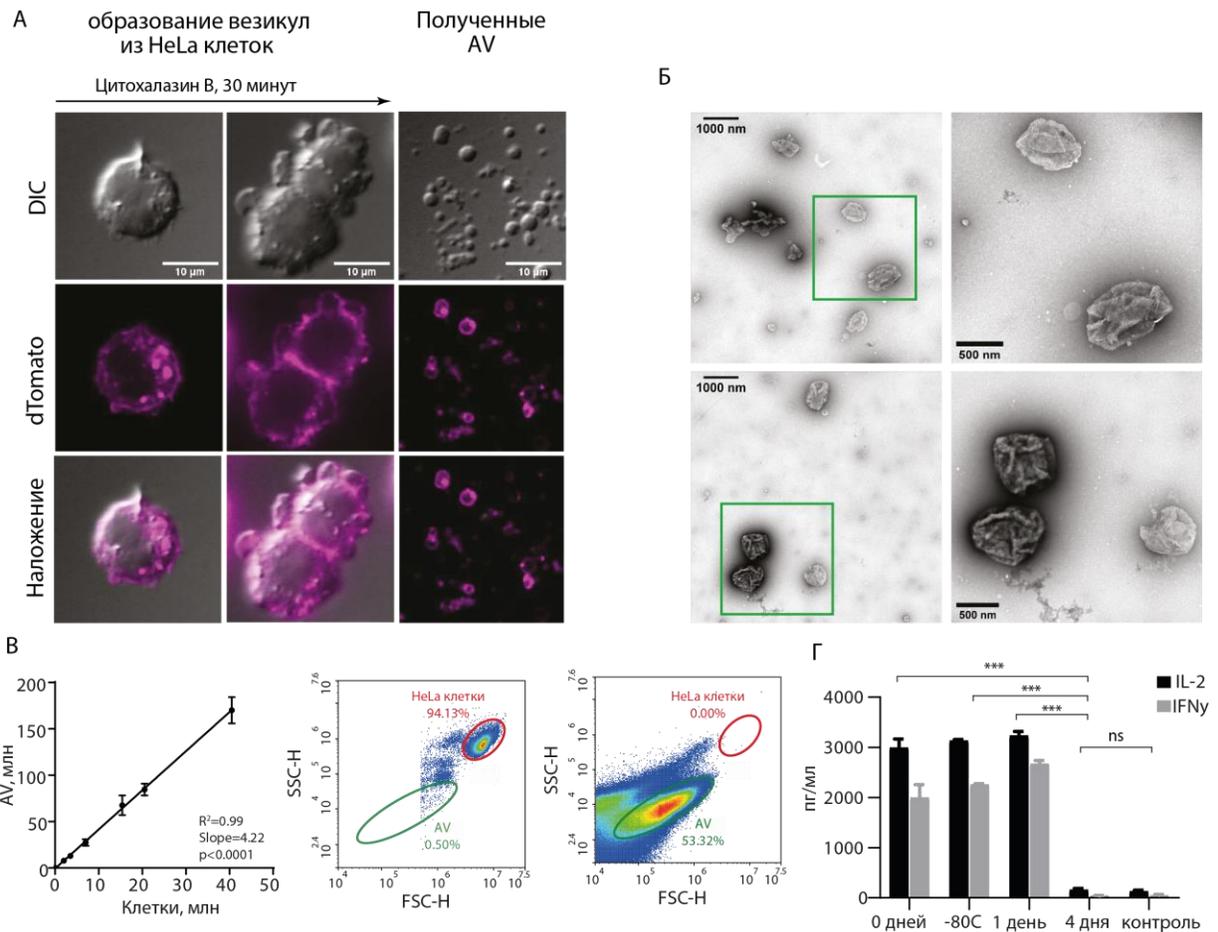
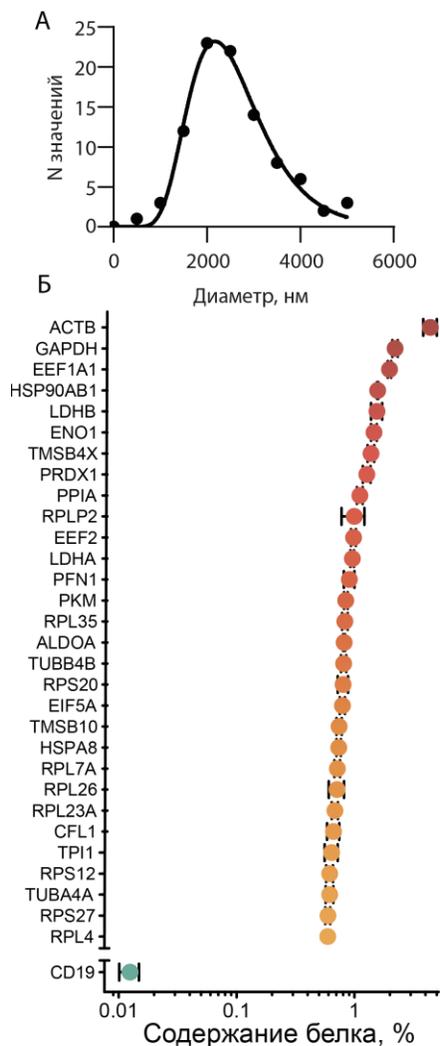


Рисунок 20. Характеристика искусственных везикул. А - Конфокальные изображения формирования AV на мембране клеток HeLa-dTomato во время обработки цитохалазином В и дальнейшей очистки. Б - ТЭМ-изображения очищенных AV при разном увеличении. В - Количественная оценка изолированных AV. График представляет собой соотношение количества клеток HeLa и выделенных из них везикул. Статистический анализ проводили с использованием модели линейной регрессии. AV были отделены от клеток HeLa и проанализированы с помощью проточной цитометрии. Данные представлены в виде двумерных точечных диаграмм. Г - Количественная оценка секреции IFN γ и IL-2 CD19-CAR Т-клетками, культивированными совместно с CD19-AV, хранившихся при -80 °C и при 4 °C в течение нескольких дней. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение.

Обработка изображений AV с помощью программного пакета ImageJ позволила установить средний диаметр везикул, который составил примерно 2400 нм. Методом

проточной цитофлуориметрии было определено, что из одной клетки HeLa можно получить примерно четыре AV (Рис. 20,В). Стабильность везикул и возможность их хранения оценивали косвенно по возможности везикул стимулировать CAR T-клетки к



выбросу провоспалительных цитокинов (Рис. 20,Г). В данном эксперименте было показано, что AV сохраняют свою стабильность при 4°C в течение 2 дней, либо более длительное время при -80°C в 10% DMSO.

Для более детального анализа состава везикул CD19-AV использовали совмещенную с жидкостной хроматографией белков масс-спектрометрию (LC-MS). Анализ очищенных AV подтвердил отсутствие в экстракте везикул ядерных белков и значительное содержание белков цитоплазмы, таких как актин, тубулин, GAPDH и другие (Рис. 21). Особенно важно, что в препарате везикул удалось обнаружить мембранный антиген CD19. Тем самым, создание линий клеток HeLa, стабильно экспрессирующих флуоресцентный белок и специфический антиген-мишень к CAR на своей поверхности, практически гарантирует получение CAR-специфических AV, которые, как будет доказано далее, могут использоваться для получения высокоэффективного CAR T-клеточного продукта.

Рисунок 21. Характеристика искусственных везикул. А - Распределение выделенных AV по размерам. Данные о размере выборки более 100 AV аппроксимированы по методу логарифмического нормального распределения (линия). Б - LC-MS анализ CD19-AV. 30 самых распространённых белков, идентифицированных в препарате AV, показаны на графике. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение из трех экспериментальных повторностей.

3.3.2. Искусственные везикулы могут быть использованы как новый класс агентов для окрашивания CAR T-клеток.

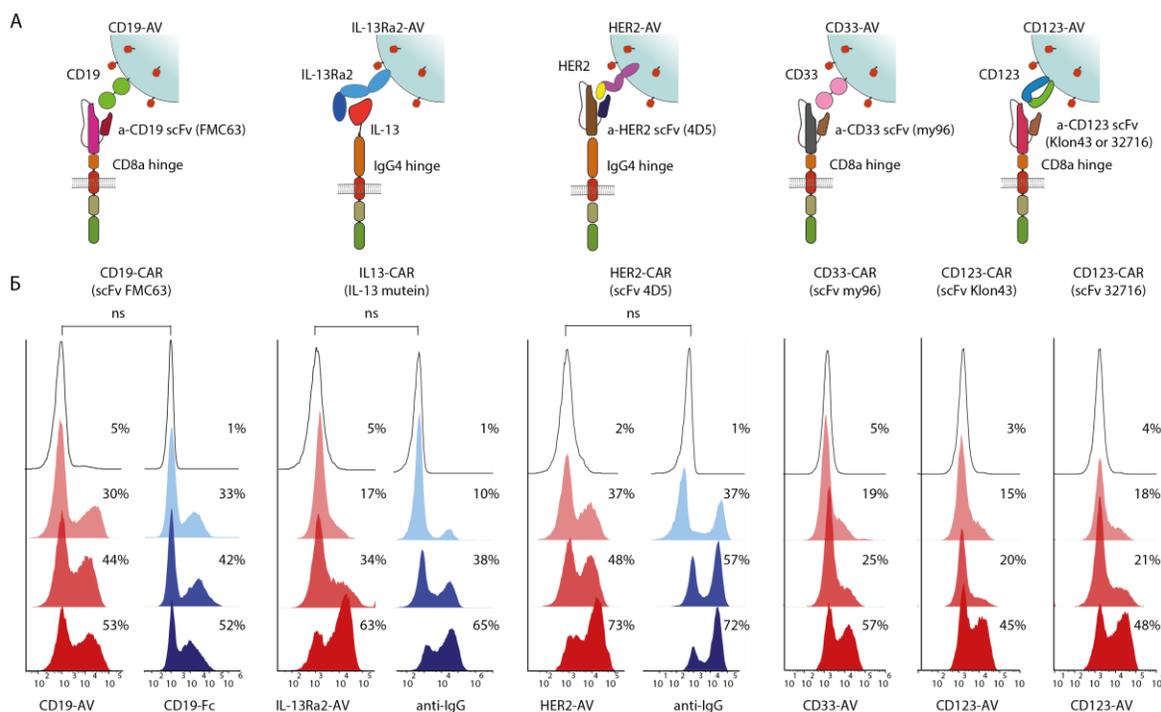


Рисунок 22. AV, экспрессирующие опухоль-ассоциированные антигены, специфически окрашивают CAR T-клетки. А - Схематические изображения взаимодействий между CAR и их целевыми антигенами, экспонируемыми на поверхности AV вместе с dTomato. Б – Параллельные окрашивания CAR-T искусственными везикулами и специфическими антителами (реагенты для обнаружения CAR). Данные представлены в виде гистограмм. Черные гистограммы показывают фоновый сигнал T-клеток. Цифры указывают пропорции обнаруженных CAR T-клеток. Данные представлены как среднее значение двух экспериментальных повторов, по крайней мере, из двух независимых экспериментов. Статистический анализ проводился с использованием непарного t-критерия.

Иногда антитела или рекомбинантные белки для обнаружения CAR недоступны у коммерческих поставщиков, в особенности, если конструкция CAR не оснащена специальным тэгом или маркером для распознавания CAR-положительных клеток антителами или флуоресцентно мечеными рекомбинантными белками-антигенами. Сложности с детекцией CD33-CAR и CD123-CAR являются характерным примером такой ситуации. В данном случае AV с заданной специфичностью (несущие на поверхности

нужные антигены) могут быть полезным реагентом для обнаружения содержащих CAR клеток. В отличие от других реагентов для детекции CAR, AV не имеют ограничений, связанных с вариациями в структуре CAR или в структуре антигена-мишени, поскольку они связываются непосредственно с экспонированной антигенсвязывающей областью CAR.

Чтобы продемонстрировать потенциал AV для детекции модифицированных Т-клеток была создана панель CAR Т-клеток (CD19-CAR, IL13-CAR, HER2-CAR, CD33-CAR и CD123-CAR), которая охватывает широкий спектр опухолевых заболеваний. Структуры соответствующих CAR и различия в структуре/связывании с соответствующими антигенами показаны на рисунке 22,А. Для экспериментов с окрашиванием с помощью флуоресцентных AV использовали CAR различной специфичности и дизайна, кодирующие CAR с вариациями в шарнирных областях (CD8a-шарнир или CH2-CH3 домена Fc IgG) или в домене распознавания мишени (scFvs или цитокин IL-13).

Способность AV специфически связывать соответствующие CAR Т-клетки была исследована различными способами. В первую очередь, CAR Т-клетки инкубировали с AV, которые содержали флуоресцентный белок, что позволяет детектировать связывание везикул с клетками методом проточной цитофлуориметрии (Рис. 22,Б). В качестве контроля использовали везикулы, не несущие опухолевые антигены. Полученные результаты демонстрируют, что AV могут связывать и окрашивать клетки CAR-Т подобно mAb или рекомбинантным белкам.

Также специфичность связывания AV с определенными CAR Т-клетками можно также использовать для обогащения CAR-положительной популяции методом флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS, fluorescence-activated cell sorting) (Рис. 23).

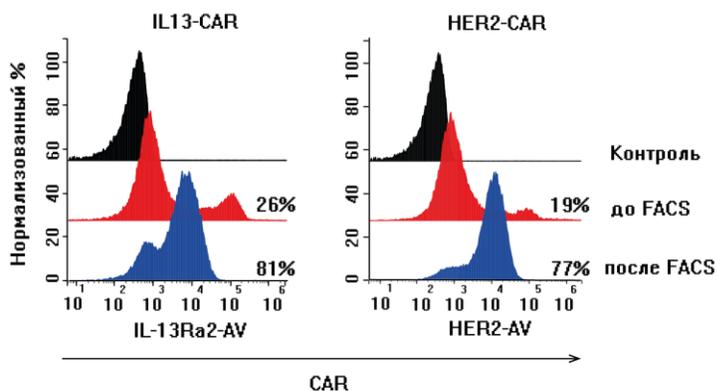


Рисунок 23. Сортировка Her2-CAR и IL13-CAR Т-клеток, окрашенных Her2-AV и IL13R2a-AV соответственно.

Метод проточной цитометрии не позволяет детально оценить характер взаимодействия

везикулы с CAR Т-клеткой. Для выяснения, каким образом везикулы взаимодействуют с

CAR T-клетками, была проведена конфокальная (Рис. 24,Б) и сканирующая микроскопии CD19-CAR T- или T-клеток (в качестве отрицательного контроля) после их инкубации с CD19-AV. Результаты данных экспериментов позволяют 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. 24,А). Таким образом, наши данные как на микроскопическом, так и на макроскопическом уровне (иммуноокрашивание + FACS) подтверждают, что химерный антигенный рецептор на поверхности T-клетки специфично распознает антиген, присутствующий на искусственных везикулах.

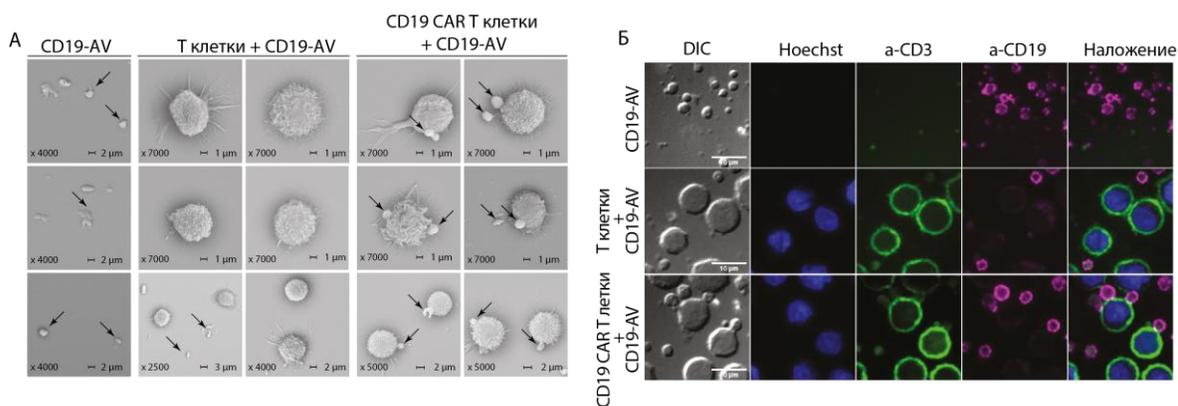


Рисунок 24. Сканирующая электронная микроскопия и конфокальные изображения CAR T-клеток, связанных с AV. А – СЭМ контрольных T-клеток и CD19-CAR T-клеток после инкубации с CD19-AV. Стрелки указывают на AV, прикрепленные к поверхности CAR T-клеток. Б - Mock T-клетки и CD19-CAR T-клетки инкубировали с CD19-AV и окрашивали анти-CD19-PE-антителом. Сигнал от mAb к CD19 показан пурпурным цветом, ядра были окрашены Hoechst 33342 (синий), а клеточная поверхность - mAb к CD3 человека (зеленый).

3.3.3. Активация CAR T-клеток AV, несущими опухоль-ассоциированные антигены.

Как и в случае EV, репортерную клеточную линию Jurkat-CAR-NFAT-fluc можно использовать для количественной оценки активации химерного антигенного рецептора искусственными везикулами. Дело в том, что уровень продукции и ферментативная активность люциферазы, синтез которой контролируется NFAT-зависимым промотором,

прямо пропорционален силе сигнала от CAR. В первую очередь, способность AV инициировать передачу активирующих сигналов CAR T-клетке была протестирована в эксперименте по инкубации CAR T-клеток с различным количеством AV (положительных и негативных по антигену). Как и ожидалось, увеличение количества везикул, приходящееся на клетку Jurkat-CAR-NFAT-luc, привело к значительному росту сигнала хемилюминесценции. Примечательно, что контрольные везикулы, полученные из исходной клеточной линии, лишенной антигена, не активировали репортерные клетки. Этот результат демонстрирует способность AV специфически стимулировать CAR T-клетки (Рис. 25,А). Далее, чтобы более подробно охарактеризовать индукцию эффекторной функции CAR-T с помощью AV, а именно продукцию провоспалительных цитокинов IFN γ и IL-2, IL13CAR или CD19-CAR T-клетки инкубировали с IL13Ra2-AV и CD19-AV, либо контрольными везикулами без антигена (Рис. 25,В) в различных соотношениях.

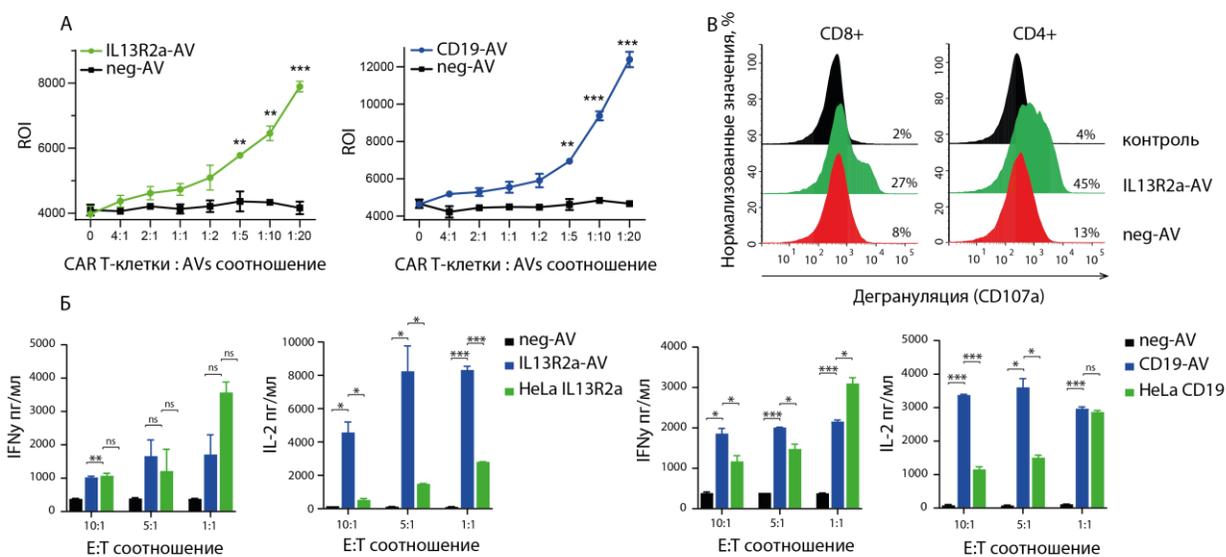


Рисунок 25. Инкубация с AV стимулирует CAR T-клетки. А - Анализ активации CAR-T Jurkat-NFAT-luc после культивирования с AV или контрольными антиген-отрицательными везикулами при различных соотношениях CAR T-клетки:AV. Б - Количественная оценка секреции IFN γ и IL-2 клетками IL13-CAR-T или CD19-CAR-T, 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 T-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 T-клеток после культивирования в течение 4 часов с IL13R2a-AV или с контрольными AV. В качестве отрицательного

контроля использовали CAR Т-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.

Положительным контролем к данному эксперименту служили клетки HeLa, содержащие IL13Ra2 или CD19 на поверхности. Количество добавленных AV было рассчитано, как описано ранее, исходя из факта, что из каждой клетки HeLa образуется примерно четыре AV. Два различных соотношения везикул-мишеней и CAR были использованы для минимизации потенциальных артефактов. При высоких соотношениях везикул к клеткам – CD19-AV и IL13Ra2-AV стимулировали и активировали CAR Т-клетки и были сопоставимы или лучше, чем соответствующие антиген-экспрессирующие клетки HeLa. Но удивительно, что в обоих типах CAR Т-клеток продукция IL-2 была намного выше как при промежуточных, так и при высоких соотношениях AV:CAR-T, чем в случае активации CAR фидерными антиген-содержащими клетками HeLa. Согласно существующим данным, общая поверхность цитоплазмы клетки HeLa должна быть намного больше, чем поверхность AV, но доступ к распластанным клеткам HeLa может быть затруднен для большого числа CAR Т-клеток, в то время как AV свободно плавают в растворе, следовательно, антиген на их поверхности более доступен для связывания с CAR Т-клеткой.

Секреция провоспалительных цитокинов, в ответ на распознавание антигена, также сопряжена с процессом выброса перфорина и гранзимов CAR Т-клетками. Данный процесс дегрануляции можно косвенно отследить по появлению лизисомального маркера CD107a на поверхности Т-клетки. Дегрануляцию в CAR Т-клетках, смешанных с IL13Ra2-AV или с контрольными AV детектировали методом проточной цитофлуориметрии. Было показано, что только антиген-положительные AV вызывают активацию как CD8⁺, так и CD4⁺ IL13-CAR Т-клеток (Рис. 25,Б).

Другой характеристикой CAR Т-клеток, которая напрямую связана с эффекторной функцией, является цитотоксичность, которая определяется способностью CAR Т-клеток убивать опухолевые клетки. Для анализа влияния CD19-AV на цитотоксичность CD19-CAR Т-клеток использовали несколько подходов:

- Колориметрический метод, детектирующий уровень активности цитозольного белка лактатдегидрогеназы (ЛДГ), который высвобождается из клеток, подвергшихся лизису;
- Измерения флуоресценции таргетных клеток с течением времени с помощью системы анализа живых клеток IncuCyte (Essen BioScience);
- Sequential killing, в котором уровень цитотоксичности и функционального истощения измеряется с течением времени при постоянном внесении дополнительных клеток-мишеней к CAR T-клеткам;

Перед проведением эксперимента CAR T-клетки выращивали в присутствии CD19-AV в течение 4-х дней и далее проводили анализ цитотоксичности. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что даже при низком соотношении CAR-T:AV (10:1) способность CD19-CAR T-клеток убивать клетки-мишени значительно увеличивается при стимуляции CD19-AV. Этот результат воспроизводился как в случае CAR T-клеток, полученных от здоровых доноров, так и для CAR T-клеток, полученных из клеток больных ОЛЛ (Рис. 26,А,В).

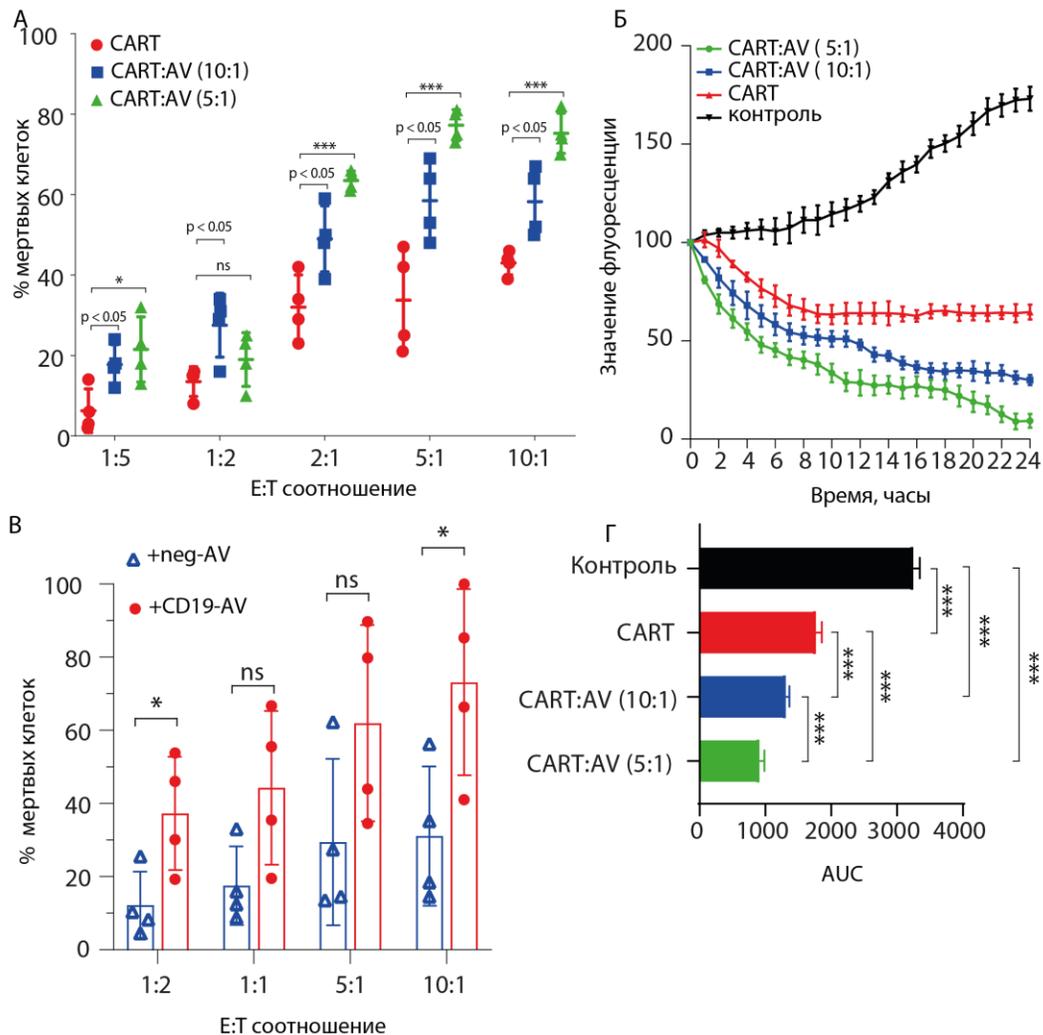


Рисунок 26. AV усиливают цитотоксические свойства CAR T-клеток. А - *In vitro* активность CD19-CAR T-клеток, культивированных с CD19-AV при соотношении CAR-T: AV 10: 1 или 5: 1. На 4 день после начала обработки везикулами CAR T-клетки инкубировали с клетками-мишенями Jeko-1 при различных соотношениях эффекторных клеток и клеток-мишеней. Б - IncuCyte анализ элиминации Jeko-1 CD19-CAR T клетками, необработанными или обработанными CD19-AV при соотношении эффекторных клеток и клеток-мишеней 3: 1. В - *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 Incucyte 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.

Данные IncuCyte анализа подтверждают наблюдение, что предварительная инкубация с AV усиливает эффекторную функцию CAR T-клеток (Рис. 26,Б и 25,Г). Чтобы проанализировать цитолитический потенциал CD19-CAR T-клеток, стимулированных CD19-AV в долгосрочном эксперименте, был проведен т. н. “sequential killing” анализ. Он позволяет оценить скорость функционального истощения T-клеток в условиях постоянного присутствия клеток-мишеней. Различие между CD19-CAR T-клетками, обработанными CD19-AV или контрольными AV, стало очевидным на 3-й день эксперимента. На 9-ый день эксперимента наблюдали потерю эффекторной активности и снижение пролиферации CD19-CAR T-клеток, обработанных контрольными AV, что, вероятно, было результатом истощения. Стимулированные CD19-AV клетки стабильно сохраняли свою цитотоксичность и пролиферативный потенциал в течение 21 дня инкубации с клетками-мишенями Јеко-1 (Рис. 27). 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.

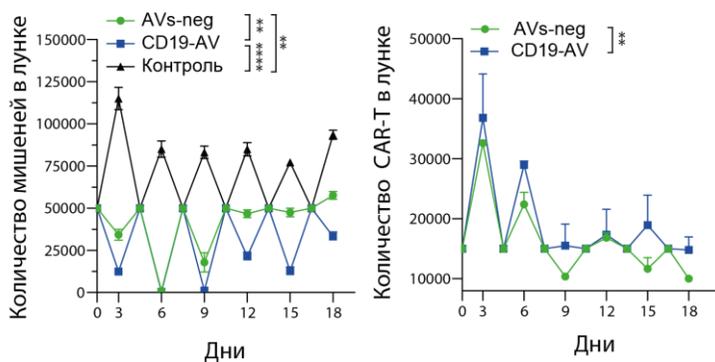


Рисунок 27. «Sequential killing» клеток-мишеней Јеко-1 CD19-CAR T клетками, обработанными CD19-AV или контрольными везикулами. Количество клеток-мишеней и CAR-T-клеток анализировали каждые 3 дня путем

иммуоокрашивания с последующей проточной цитометрией. Оставшиеся клетки CAR-T смешивали со свежими клетками-мишенями в прежнем соотношении и инкубировали еще 3 дня. Процедуру повторяли несколько раз в течение 18 дней. Графики показывают количество выживших клеток-мишеней и эффекторных клеток. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение из трех экспериментальных повторов и представляют не менее двух независимых экспериментов. Статистический анализ проводили, используя t-критерий Стьюдента.

3.3.4. Изучение влияния AV на пролиферацию и дифференцировку CAR T-клеток.

Затем мы решили определить, можно ли использовать AV для антиген-специфической экспансии CAR-T-клеток. Чтобы проверить это, CD19-положительные (CD19-AV) и контрольные, не содержащие антиген CD19 AV (neg-AV), везикулы добавляли к клеткам CD19-CAR T, меченным CFSE. CFSE использовали для анализа скорости пролиферации клеток, снижение сигнала флуоресценции которого пропорционально числу клеточных делений. CD19-CAR T клетки стимулировали в течение 4 дней и оценивали флуоресценцию CFSE с помощью проточной цитофлуориметрии. Как и ожидалось, в образце CAR T-клеток, инкубированных с контрольными AV, отсутствовал прирост популяции, 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. 28,А).

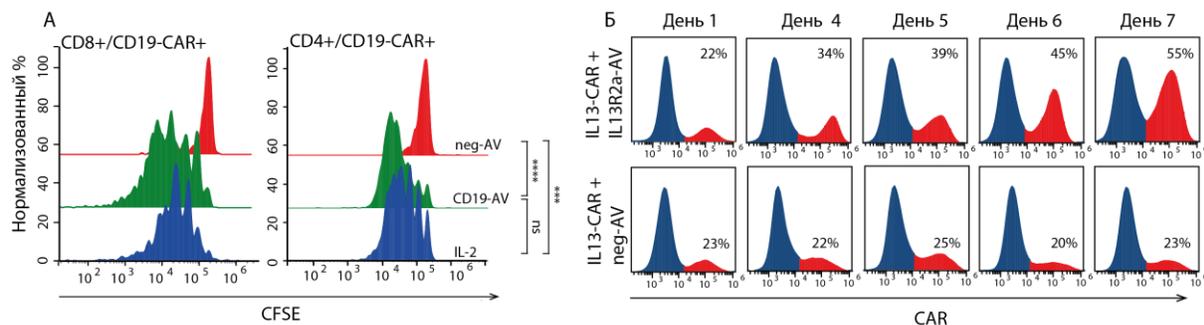


Рисунок 28. Антиген-специфическая экспансия CAR T-клеток. А - Анализ CD19-CAR T-клеток, меченных CFSE. Клетки культивировали в присутствии IL-2, CD19-AV или контрольных AV в соотношении 5:1 в течение 4 дней. Уменьшение сигнала CFSE оценивали с помощью проточной цитометрии. Данные представлены как среднее \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 (neg-AV) в соотношении 5:1 в течение 7 дней. Значения на графиках показывают долю CAR T-клеток в суспензии.

Так как стимуляция AV является антиген-специфичной, только CAR-положительные клетки активно пролиферируют. На основании полученных данных было сделано предположение, что вследствие инкубации CAR T-клеток с AV может увеличиться процент CAR-положительной популяции в смеси T-клеток. Для определения процента T-клеток,

экспрессирующих IL13-CAR, клетки инкубировали с IL13R2a-положительными (IL13R2a-AV) или IL13R2a-отрицательными контрольными AV (neg-AV) и оценивали процент клеток, содержащих IL13-CAR на 1, 4, 5, 6 и 7 дни после первого добавления везикул. В образцах, стимулированных контрольными AV, CAR-положительная фракция оставалась почти постоянной. Напротив, в образцах, стимулированных IL13R2a-AV, доля CAR T-клеток резко увеличилась с 22% в день 1 до 55% в день 7. Можно с уверенностью сказать, что полученные данные продемонстрировали эффективность антиген-экспрессирующих AV для специфической стимуляции и экспансии CAR T-клеток в смеси с не модифицированными CAR T-лимфоцитами (Рис. 28,Б).

Известно, что процесс активной пролиферации в условиях хронической стимуляции CAR T-клеток неминуемо ведет к их истощению и смерти (67,69). В процессе создания эффективного CAR T-клеточного продукта различные манипуляции направлены на сохранение эффекторного фенотипа и замедление процесса истощения. Исходная гетерогенность клеток донора часто усложняет эту задачу, что приводит к снижению эффективности CAR T-клеточной терапии. Возможно, использование AV в процессе создания CAR T-клеток также способно приводить к истощению T-клеток. Чтобы выяснить влияние AV на фенотип CD19-CAR T-клеток, активированные различными стимулирующими агентами, в том числе CD19-AV, CD19-CAR-T были проанализированы на маркеры истощения и дифференцировки T-клеток. В данном эксперименте использовали следующие условия стимуляции CAR T-клеток:

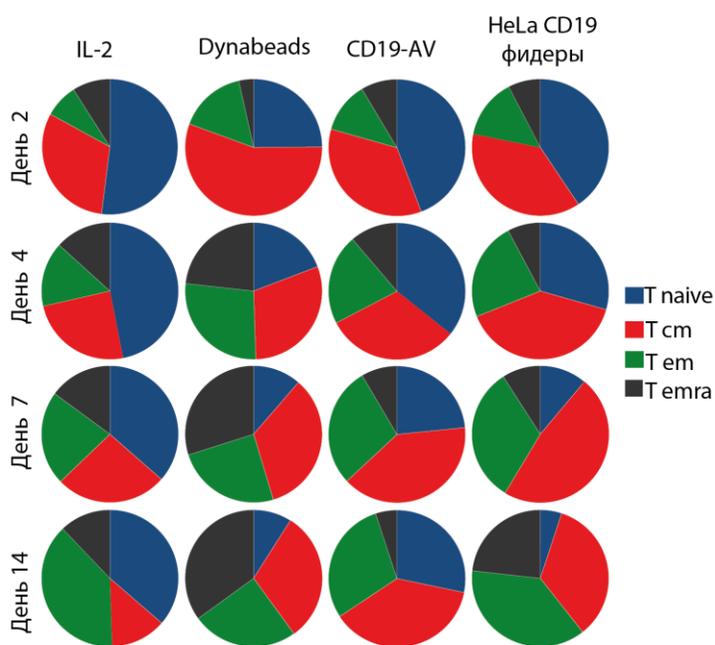
- CD3/CD28 Dynabeads в присутствии IL-2 использовали как альтернативный, антиген-независимый вид стимуляции T-клеток через TCR
- IL- 2 – стандартный метод, использующийся для экспансии CAR T-клеток
- CD19-AV – искусственные везикулы, экспрессирующие маркер CD19
- HeLa CD19 –фидерные клетки несущие антиген

CD19-CAR T-клетки, стимулированные перечисленными способами, инкубировали 14 дней и анализировали по нескольким параметрам:

- Скорость пролиферации
- Соотношение CD4⁺/CD8⁺ клеток и процент CAR⁺CD4⁺ и CAR⁺CD8⁺ клеток

- Фенотип Т-клеток (по маркерам CD62L/CD45RA на поверхности клеток, дифференцировка Т-клеток (4 популяции T_{naive} , T_{em} , T_{cm} , T_{emra})
- Процент Т-клеток, положительных по маркерам истощения (TIGIT, CD57, PD-1)

На 7 и 14 день скорость пролиферации стимулированных AV CAR Т-клеток была в пять раз выше в сравнении с условиями, где клетки стимулировали Dynabeads/IL-2 или HeLa CD19 (Рис. 31,А). Интересно, что стимуляция Т-клеток Dynabeads/IL-2 и HeLa CD19 преимущественно способствовала пролиферации $CD4^+$ Т-клеток (Рис. 31,Б). В свою очередь, существенное увеличение CAR-положительной популяции наблюдалось только при стимуляции CD19-AV как для $CD4^+$, так и для $CD8^+$ Т-клеток (с 23% до 31% для $CD4^+$ Т-клеток и с 13% до 22% для $CD8^+$) (Рис. 31,Б,В). Увеличение CAR-положительной популяции также наблюдалось в аналогичных экспериментах с Т-клетками из четырех пациентов с ОЛЛ (Рис. 30,Б). Анализ фенотипа CAR Т-клеток на 7 и 14 день культивации, в случае стимуляции CD19-AV, показал сохранение Т-клеток в состоянии T_{naive} и T_{cm} , в то время как стимуляция Dynabeads/IL-2 или фидерными клетками приводила к преобладанию



популяций T_{em} и T_{emra} (Рис. 29).

Рисунок 29. 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 \pm стандартное отклонение из трех экспериментальных повторов и представляют не менее двух независимых экспериментов.

Проанализировав количество Т-клеток, экспрессирующих маркеры истощения PD-1 и TIGIT, мы установили, что на 14-й день для CAR Т-клеток, стимулированных CD19-AV,

процент TIGIT⁺ клеток был самым низким, по сравнению с другими группами (Рис. 31,Г). В то же время, у CAR T-клеток, стимулированных IL-2, доля TIGIT⁺ клеток постепенно увеличивалась. Стоит отметить, что частота T-клеток, экспонирующих на поверхности PD-1, резко возрастала в образцах, стимулированных фидерными клетками HeLa CD19. Инкубация CAR T-клеток в присутствии IL-2 приводила к более сильной активации CAR-T-клеток по сравнению с CD19-AV и другими группами, что было заметно по увеличению уровню маркера CD57 (Рис. 31,Г).

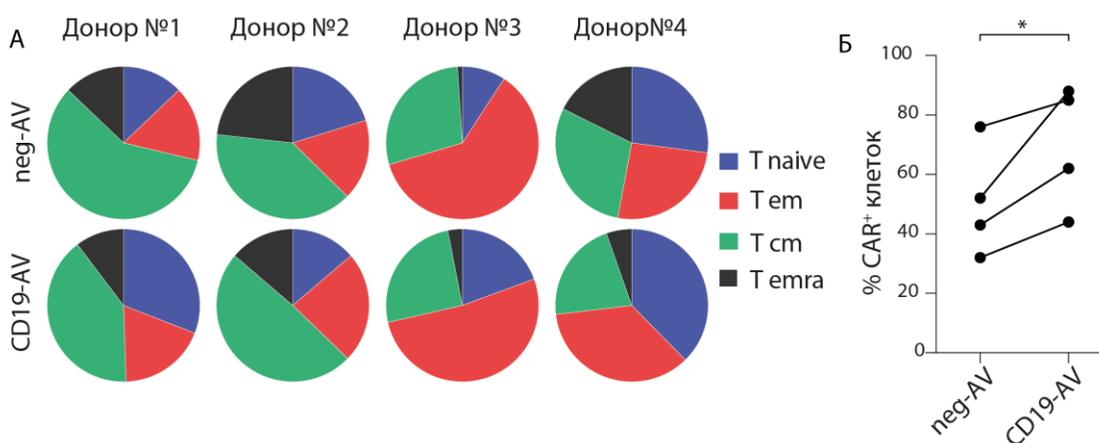


Рисунок 30. Получение и характеристика CD19-CAR клеток из T-клеток больных ОЛЛ. А - Оценка изменения состояния дифференцировки клеток CD19-CAR, полученных из T-клеток больных ОЛЛ, в ответ на стимуляцию CD19-AV. Б – Оценка CAR-положительной популяции в образцах CD19-CAR, обработанных CD19-AV и neg-AV. А,Б - Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение из трех экспериментальных повторов и представляют не менее двух независимых экспериментов. Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Для дальнейшей оценки трансляционного потенциала получаемых CAR-T мы размножали CD19-CAR в условиях активации и экспансии с CD19-AV или контрольными AV, используя в качестве стартовой популяции периферические лимфоциты, выделенные из пациентов с ОЛЛ. Как и ожидалось, именно в присутствии CD19-AV клетки CD19-CAR сохраняли более наивное состояние, с меньшим количеством T_{emra} (Рис. 30,А).

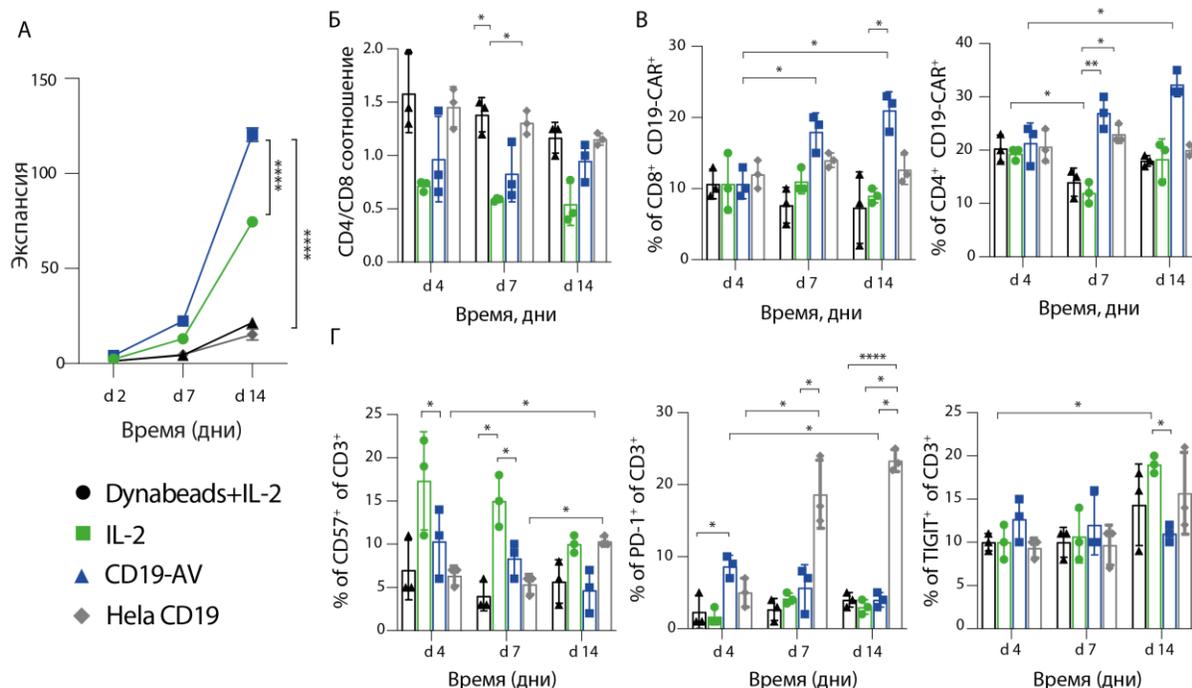


Рисунок 31. Анализ популяционных и фенотипических изменений CD19-CAR T-клеток, вызванных стимуляцией CD19-AV. А – Анализ экспансии CAR T-клеток подвергшихся воздействию различных стимулов активации. Б - Оценка изменений соотношения CD4/CD8 в популяции клеток CD19-CAR-T, подвергшихся воздействию различных 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 \pm стандартное отклонение из трех экспериментальных повторов и представляют не менее двух независимых экспериментов. Статистический анализ проводили, используя дисперсионный анализ ANOVA.

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

Чтобы изучить как CD19-CAR T-клетки, полученные *ex vivo* с помощью стимуляции CD19-AV, ведут себя в трансплантационной модели *in vivo*, был осуществлен эксперимент на мышах линии NSG (Рис. 32). Данная линия мышей сочетает в себе особенности склонных к развитию аутоиммунного диабета мышей NOD/ShiLtJ и линий с тяжелой

формой комбинированного иммунодефицита SCID, вызванного нокаутом общей гамма цепи рецепторов интерлейкинов (common γ c, этот полипептид является частью рецепторов IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 и IL-21). Генетические дефекты мышей линии NSG обуславливают полное отсутствие у этих животных Т-клеток и подавляющего большинства миелоидных субпопуляций клеток иммунной системы. Это делает их незаменимым инструментом для экспериментов по ксенотрансплантации опухолей человека, гемопоэтических стволовых клеток и адоптивного переноса Т-клеток. Для прижизненной визуализации роста опухоли и изучения терапевтического эффекта CAR-T нами была создана линия клеток Nalm-6, несущая ген люциферазы ffluc под контролем конститутивного промотора. Мышам линии NSG внутривенно вводили 1 миллион клеток Nalm-6-ffluc. На 6 день (когда опухоли стали детектируемы на приборе IVIS) мышей случайным образом разделили на 3 группы, которым вводили контрольные Т-клетки (Mock-T), CD19-CAR Т-клетки полученные с применением CD19-AV, либо CD19-CAR Т клетки, полученные с использованием IL-2. Динамику роста опухоли оценивали каждые 4 дня с помощью интраперитонеального введения D-люциферина и визуализации сигнала люциферазы на приборе IVIS. Через 14 дней после введения CAR Т-клеток, которые были получены в присутствии IL-2 либо CD19-AV, опухоли стали практически не детектируемыми, что резко контрастировало с контрольной группой (Рис. 32,Б).

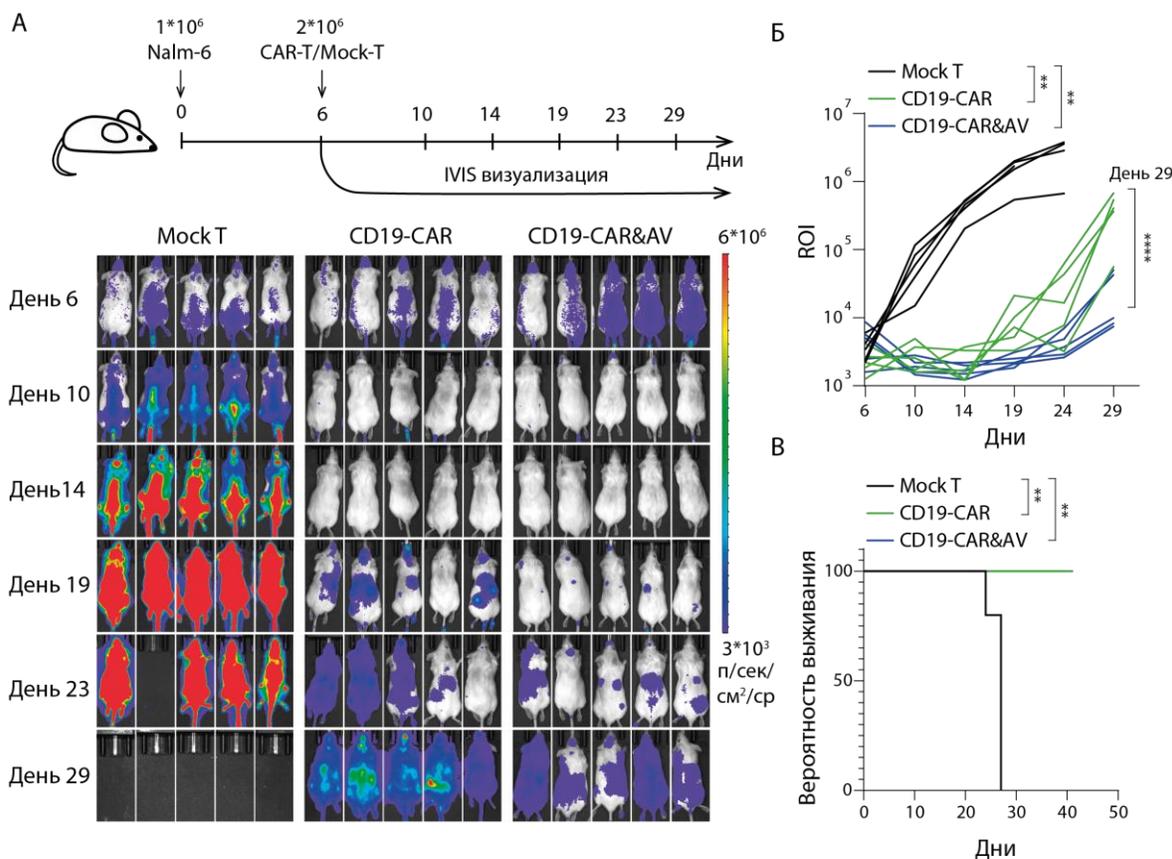


Рисунок 32. Билюминесцентная визуализация NSG мышей, которым ввели клетки лимфомы человека Nalm-6, синтезирующие люциферазу, а затем CD19-CAR T-клетки, предварительно стимулированные CD19-AV или IL-2. А - Мышам с развившейся опухолью на 6 день вводили равное количество контрольных T-клеток (Mock-T) человека или CD19-CAR T-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 ± стандартное отклонение (n=5).

На 19-й день у мышей, которым вводили CD19-CAR T-клетки активированные IL-2, произошел рецидив опухоли, в то время как в группе с CAR T-клетками, стимулированными AV, сохранялась продолжительная ремиссия. Животные в группах, получавших CD19-CAR, которые инкубировали с IL-2 или AV показали одинаковую выживаемость, которая значительно превысила выживаемость мышей, получивших

контрольные Mock-T (Рис. 31,В). Суммируя, можно сказать, что антигенные искусственные везикулы AV позволяют повысить эффективность CAR-T терапии *in vivo* (Рис. 32,А).

Использование антигенных искусственных антигенных везикул при создании CAR T-клеток является абсолютно уникальной и простой в реализации технологией. Метод получения и применения AV для размножения в культуре CAR T-клеток, с большой вероятностью значительно облегчит, удешевит и ускорит получение эффективных терапевтических CAR T-клеток с улучшенными характеристиками. Несмотря на опухолевое происхождение AV, они положительно влияют на популяцию CAR-положительных клеток, вызывая их активацию и активную пролиферацию. AV стимулируют только свои антиген-специфичные T-клетки, тем самым избегая размножения сосуществующих нетрансдуцированных T-клеток, а также позволяют получить CAR T-клеточный продукт с наиболее благоприятными для терапии характеристиками. Кроме того, разработанная нами технология AV отлично вписывается в существующие модели би-специфичных и три-специфичных CAR T-клеток, так как позволяет быстро подбирать дизайн молекул представленных на поверхности везикул, и создавать универсальные AV, которые будут одновременно активировать CAR T-клетки, несущие различные химерные антигенные рецепторы.

Подходы в борьбе с опухолевыми заболеваниями не ограничиваются усовершенствованием технологии создания CAR T-лимфоцитов. Без преодоления иммуносупрессорного опухолевого микроокружения CAR T-клетки будут лишены возможности выполнять свои цитотоксические функции. Известно, что образующиеся в опухоли NET (сети из конденсированной ДНК, neutrophil extracellular traps) препятствуют проникновению иммунных клеток в область опухоли и промотируют образование метастазов. Кроме того, образование NET может приводить к формированию резистентности опухоли к химиотерапии и нарушению работы различных органов. Также было показано, что NET обертывают и покрывают опухолевые клетки и защищают их от цитолиза CD8⁺ T-лимфоцитами и натуральными киллерами, препятствуя контакту между иммунными клетками и опухолевыми. Логично предположить, что разрушение NET в опухоли может открыть доступ для проникновения иммунных эффекторных клеток. Следующая часть работы посвящена созданию вектора на основе аденоассоциированного вируса для специфической экспрессии ДНКазы I в печени. Как будет показано далее,

однократное введение данного вируса позволяет подавить развитие метастазов в печени и запустить противоопухолевый иммунный ответ.

3.4. Изучение влияния ДНКазы I для уменьшения негативных эффектов опухолевого микроокружения

Дезоксирибонуклеаза I (ДНКаза I) является эндонуклеазой, которая избирательно расщепляет фосфодиэфирную связь в ДНК (153). Известно, что ДНКаза I является потенциальным биомаркером у онкологических больных, который свидетельствует об успехе терапии и коррелирует с продолжительностью ремиссии (154,155). Кроме того, ДНКаза I проявляет определенные антиметастатические эффекты в ряде различных моделей опухолей (156). Однако использование ДНКазы I в качестве лекарственного средства имеет ограничения из-за ее короткого периода полувыведения, потенциальной необходимости использования в течение всей жизни и наличия сильнодействующих ингибиторов ДНКазы I в крови больных раком. Например, актин, основной компонент системы микрофиламентов эукариотических клеток, может связывать ДНКазу I с наномолярным средством и почти полностью ингибировать ферментативную активность ДНКазы I (157).

Для создания ДНКазы I, нечувствительной к ингибированию актином, была создана мутантная форма ДНКазы I с аминокислотными заменами Q9R/E13R/N74K/A114F, в результате чего была получена ДНКаза I с повышенной ферментативной активностью и резистентностью к ингибированию актином.

Для решения проблемы короткого времени циркуляции ДНКазы I в данной работе было предложено использовать вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV). За счет наличия специфического промотора и гепатотропного AAV, использующего капсид Apc80L65, ген ДНКазы I может быть доставлен специфично в клетки печени (158). Таким образом, AAV-опосредованный перенос гена ДНКазы I может стать эффективной альтернативой долгосрочным ежедневным инъекциям препарата очищенной ДНКазы I.

В данной работе действие ДНКазы I было изучено на мышинной модели колоректального рака (CRC), который является третьим по распространенности в мире. Печень является наиболее частым местом метастазирования CRC, так как большая часть кишечного дренажа брыжейки проходит через печеночную портальную венозную систему.

3.4.1. Трансдукция AAV, содержащим кДНК ДНКазы I, культивируемых клеток гепатомы человека приводит к секреции ДНКазы I.

Для подтверждения работоспособности AAV-ДНКазы I, полученные Anc80L65 аденоассоциированные вирусы использовали для эктопической секреции этого фермента клетками гепатомы (Рис. 33,А). Клетки гепатомы HepG2 трансдуцировали вирусными частицами AAV-ДНКазы I, либо контрольными вирусами AAV-null. Для анализа активности ДНКазы *in vitro* собирали супернатанты культур клеток и оценивали изменение уровня активности ДНКазы с течением времени. Полученные зависимости активности от времени представлены на рисунке 33,Б. Вирус AAV-ДНКазы I эффективно трансдуцировал клетки HepG2, что приводило к значительному увеличению активности ДНКазы I в супернатантах вплоть до 72 часов после трансдукции. Аналогичным образом, активность ДНКазы I в супернатанте культуры также сильно возрастала при увеличении количества вируса в пересчете на одну клетку (1×10^4 – 1×10^6 копий гена на клетку). Потенциальную токсичность конструкции AAV-ДНКазы I сравнивали с токсичностью для клеток контрольной конструкции AAV-null. После трансдукции AAV-ДНКазы I доля мертвых клеток через 5 дней существенно не отличалась от доли мертвых клеток HepG2 после трансдукции AAV-null не зависимо от концентрации добавленных вирусных частиц. Эти данные показывают, что AAV-опосредованный перенос гена ДНКазы I в клетки гепатоцитарного происхождения *in vitro* приводит к устойчивой секреции ДНКазы I в дозозависимой манере и не оказывает заметного токсического эффекта.

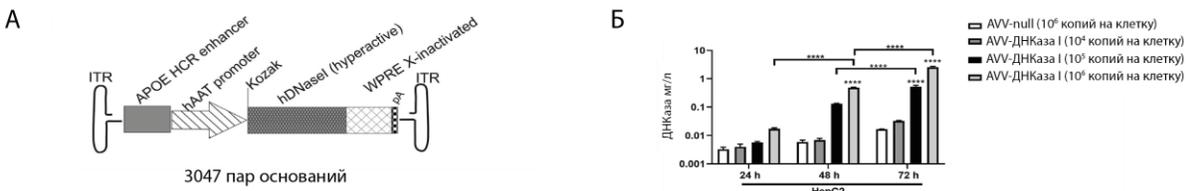


Рисунок 33. Создание аденоассоциированных вирусов, несущих ДНКазу, и оценка активности, полученной ДНКазы *in vitro*. А – Схематическое изображение конструкции AAV-ДНКазы I. Б – Анализ *in vitro* активности ДНКазы на клеточной линии HEPG2 при добавлении различного количества AAV-ДНКазы I, либо AAV-null к клеткам. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

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

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. 34,А).

Биолюминесцентная визуализация опухоли показала, что развитие метастазов у мышей, обработанных AAV-ДНКазой I, было снижено по сравнению с мышами в группе, которым вводили AAV-null ($P < 0,05$) (Рис. 34,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. 33Д,Е). Введение AAV-ДНКазы I также значительно уменьшало количество метастатических узелков ($P < 0,05$) (Рис. 33В, Г). Эти результаты дополнительно подтверждают, что обработка AAV-ДНКазой I ингибирует прогрессирование метастазов в печени в модели CRC.

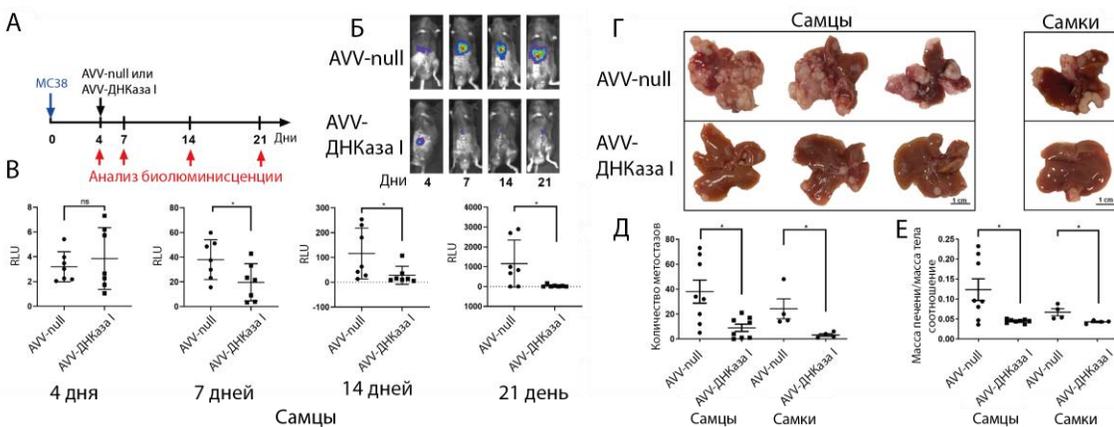


Рисунок 34. Анализ активности AAV-ДНКазы I *in vivo* на мышинной модели колоректального рака (перевиваемая клеточная линия MC38). А – схема эксперимента. Б - Мышам с развившейся опухолью на 4 день вводили равное количество AAV-ДНКазы I, либо AAV-null. В – Динамика роста опухоли по данным биолюминесцентной визуализации, измеренная с течением времени в двух группах, пролеченных либо AAV-ДНКазой I, либо AAV-null. Г – Изображения, характеризующие количество метастазов на 21 день после введения опухоли в группах мышей, пролеченных либо AAV-ДНКазой 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. В-Е - Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

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

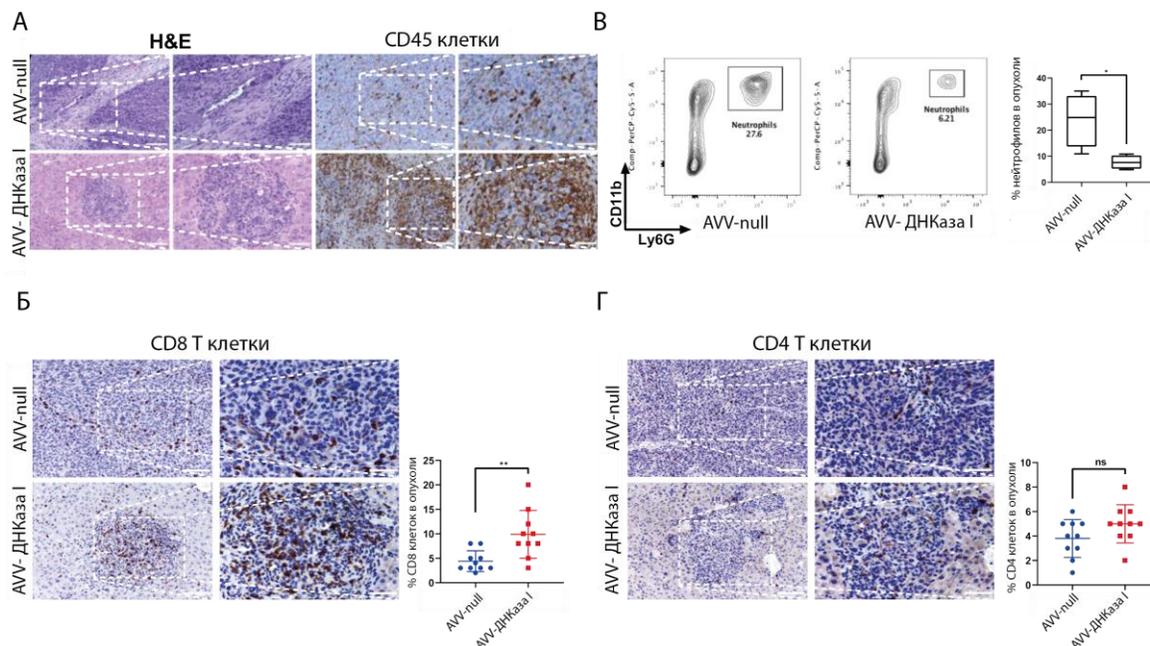


Рисунок 35. Анализ иммунных клеток в опухолях мышей, пролеченных либо AAV-ДНКазы I, либо AAV-null. А – Иммуногистохимия опухолей, окрашенных на CD45 Б - Иммуногистохимия опухолей, окрашенных на CD8 В – Цитофлуориметрический анализ клеток, выделенных из опухолевого микроокружения, на присутствие опухолеассоциированных нейтрофилов. Г - Иммуногистохимия опухолей, окрашенных на CD4.

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. 35). По сравнению с группой, обработанной AAV-null, процент CD8⁺ Т-клеток в участке опухоли был значительно увеличен в группе AAV-ДНКазы I (P <0,01) (Рис. 35,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-ДНКазы I, существенно не отличался от такового в группе, обработанной контрольным AAV-null (Рис. 35,Г). 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-ДНКазы I, по сравнению с мышами, обработанными AAV-null (P <0,05). В то время как, хоть и незначительно, доля CD4⁺ Т-клеток имела тенденцию к повышению у мышей, получавших AAV-ДНКазы I. Также, методом проточной цитометрии, было обнаружено, что ДНКазы I позволяет снизить количество опухолеассоциированных нейтрофилов в ТМЕ (Рис. 35,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.

Таким образом, наши результаты доказывают, что AAV опосредованный 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.

4. 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.

5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jorgensen JL, Reay PA, Ehrich EW, Davis MM. Molecular components of T-cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:835–73.
2. Miller JF. Immunological function of the thymus. *Lancet.* 1961 Sep 30;2(7205):748–9.
3. Miller J. The early work on the discovery of the function of the thymus, an interview with Jacques Miller. *Cell Death Differ.* 2020 Jan;27(1):396–401.
4. Klein G, Sjögren HO, Klein E, Hellström KE. Demonstration of Resistance against Methylcholanthreneinduced Sarcomas in the Primary Autochthonous Host. *Cancer Res.* 1960 Dec 1;20(11):1561–72.
5. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science.* 1986 Sep 19;233(4770):1318–21.
6. Greenberg PD. Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv Immunol.* 1991;49:281–355.
7. Melief CJ. Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes. *Adv Cancer Res.* 1992;58:143–75.
8. Old LJ. Tumor immunology: the first century. *Curr Opin Immunol.* 1992 Oct;4(5):603–7.
9. Rosenberg SA, Lotze MT. Cancer immunotherapy using interleukin-2 and interleukin-2-activated lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 1986;4:681–709.
10. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science.* 1986 Sep 19;233(4770):1318–21.
11. Hong JJ, Rosenberg SA, Dudley ME, Yang JC, White DE, Butman JA, et al. Successful Treatment of Melanoma Brain Metastases with Adoptive Cell Therapy. *Clin Cancer Res.* 2010 Oct 1;16(19):4892–8.
12. Jochems C, Schlom J. Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity. *Exp Biol Med (Maywood).* 2011 May 1;236(5):567–79.
13. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood.* 1995 Sep 1;86(5):2041–50.
14. Riddell SR, Greenberg PD. Principles for adoptive T cell therapy of human viral diseases. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:545–86.

15. Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, et al. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med.* 1979 May 10;300(19):1068–73.
16. *Encyclopedia of Immunobiology.* Academic Press; 2016. 3161 p.
17. Miller AD. Retrovirus packaging cells. *Hum Gene Ther.* 1990;1(1):5–14.
18. Cinader B, Miller RG. *Progress in Immunology VI: Sixth International Congress of Immunology.* Elsevier; 2014. 1176 p.
19. Sadelain M, Rivière I, Riddell S. Therapeutic T cell engineering. *Nature.* 2017 May 24;545(7655):423–31.
20. Sadelain M, Rivière I, Brentjens R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jan;3(1):35–45.
21. Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol.* 2009 Apr;21(2):215–23.
22. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Dec;86(24):10024–8.
23. Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. *J Exp Med.* 1995 May 1;181(5):1653–9.
24. Jensen MC, Popplewell L, Cooper LJ, DiGiusto D, Kalos M, Ostberg JR, et al. Antitransgene Rejection Responses Contribute to Attenuated Persistence of Adoptively Transferred CD20/CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor Redirected T Cells in Humans. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2010 Sep 1;16(9):1245–56.
25. Krause A, Guo H-F, Latouche J-B, Tan C, Cheung N-KV, Sadelain M. Antigen-dependent CD28 Signaling Selectively Enhances Survival and Proliferation in Genetically Modified Activated Human Primary T Lymphocytes. *J Exp Med.* 1998 Aug 17;188(4):619–26.
26. Brentjens RJ, Latouche J-B, Santos E, Marti F, Gong MC, Lyddane C, et al. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med.* 2003 Mar;9(3):279–86.
27. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med.* 2013 Mar 20;5(177):177ra38.
28. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Rivière I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol.* 2002 Jan;20(1):70–5.

29. Hinrichs CS, Restifo NP. Reassessing target antigens for adoptive T cell therapy. *Nat Biotechnol.* 2013 Nov;31(11):999–1008.
30. van der Stegen SJC, Hamieh M, Sadelain M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. *Nat Rev Drug Discov.* 2015 Jul;14(7):499–509.
31. Zhao Z, Condomines M, van der Stegen SJC, Perna F, Kloss CC, Gunset G, et al. Structural design of engineered costimulation determines tumor rejection kinetics and persistence of CAR T cells. *Cancer Cell.* 2015 Oct 12;28(4):415–28.
32. Kawalekar OU, O’Connor RS, Fraietta JA, Guo L, McGettigan SE, Posey AD, et al. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity.* 2016 Feb 16;44(2):380–90.
33. Lamers CHJ, Sleijfer S, Vulto AG, Kruit WHJ, Kliffen M, Debets R, et al. Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma With Autologous T-Lymphocytes Genetically Retargeted Against Carbonic Anhydrase IX: First Clinical Experience. *JCO.* 2006 May 1;24(13):e20–2.
34. Brentjens R, Yeh R, Bernal Y, Riviere I, Sadelain M. Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia With Genetically Targeted Autologous T Cells: Case Report of an Unforeseen Adverse Event in a Phase I Clinical Trial. *Mol Ther.* 2010 Apr;18(4):666–8.
35. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2011 Aug 25;365(8):725–33.
36. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. *New England Journal of Medicine.* 2013 Apr 18;368(16):1509–18.
37. Rosenbaum L. Tragedy, Perseverance, and Chance — The Story of CAR-T Therapy. *New England Journal of Medicine.* 2017 Oct 5;377(14):1313–5.
38. Gargett T, Brown MP. The inducible caspase-9 suicide gene system as a “safety switch” to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Front Pharmacol.* 2014 Oct 28;5:235.
39. Hartmann J, Schüßler-Lenz M, Bondanza A, Buchholz CJ. Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol Med.* 2017 Sep;9(9):1183–97.
40. Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(8):1145–54.
41. van Herpen CML, van der Laak JAWM, de Vries IJM, van Krieken JH, de Wilde PC, Balvers MGJ, et al. Intratumoral recombinant human interleukin-12 administration in head and neck squamous cell carcinoma patients modifies locoregional lymph node architecture

- and induces natural killer cell infiltration in the primary tumor. *Clin Cancer Res.* 2005 Mar 1;11(5):1899–909.
42. Zhang E, Xu H. A new insight in chimeric antigen receptor-engineered T cells for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol.* 2017 Jan 3;10:1.
 43. Sachdeva M, Busser BW, Temburni S, Jahangiri B, Gautron A-S, Maréchal A, et al. Repurposing endogenous immune pathways to tailor and control chimeric antigen receptor T cell functionality. *Nat Commun.* 2019 Nov 13;10(1):5100.
 44. Ren J, Zhao Y. Advancing chimeric antigen receptor T cell therapy with CRISPR/Cas9. *Protein Cell.* 2017 Sep;8(9):634–43.
 45. Wu L, Wei Q, Brzostek J, Gascoigne NRJ. Signaling from T cell receptors (TCRs) and chimeric antigen receptors (CARs) on T cells. *Cell Mol Immunol.* 2020 Jun;17(6):600–12.
 46. Larson RC, Maus MV. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells. *Nat Rev Cancer.* 2021 Mar;21(3):145–61.
 47. Feng Y, Reinherz EL, Lang MJ. $\alpha\beta$ T Cell Receptor Mechanosensing Forces out Serial Engagement. *Trends Immunol.* 2018 Aug;39(8):596–609.
 48. Davis SJ, van der Merwe PA. The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond. *Nat Immunol.* 2006 Aug;7(8):803–9.
 49. Brameshuber M, Kellner F, Rosboth BK, Ta H, Alge K, Sevcsik E, et al. Monomeric TCRs drive T cell antigen recognition. *Nat Immunol.* 2018 May;19(5):487–96.
 50. Chang ZL, Lorenzini MH, Chen X, Tran U, Bangayan NJ, Chen YY. Rewiring T-cell responses to soluble factors with chimeric antigen receptors. *Nat Chem Biol.* 2018 Mar;14(3):317–24.
 51. Tischer DK, Weiner OD. Light-based tuning of ligand half-life supports kinetic proofreading model of T cell signaling. *eLife.* 8:e42498.
 52. Salter AI, Ivey RG, Kennedy JJ, Voillet V, Rajan A, Alderman EJ, et al. Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function. *Sci Signal.* 2018 Aug 21;11(544):eaat6753.
 53. Watanabe K, Kuramitsu S, Posey AD, June CH. Expanding the Therapeutic Window for CAR T Cell Therapy in Solid Tumors: The Knowns and Unknowns of CAR T Cell Biology. *Front Immunol.* 2018 Oct 26;9:2486.
 54. Laidlaw BJ, Craft JE, Kaech SM. The multifaceted role of CD4⁺ T cells in CD8⁺ T cell memory. *Nat Rev Immunol.* 2016 Feb;16(2):102–11.

55. Benmebarek M-R, Karches CH, Cadilha BL, Lesch S, Endres S, Kobold S. Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 14;20(6):1283.
56. Cullen SP, Martin SJ. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ.* 2008 Feb;15(2):251–62.
57. Croft M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol.* 2009 Apr;9(4):271–85.
58. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2012 Nov;12(11):749–61.
59. McLellan AD, Rad SMAH. Chimeric antigen receptor T cell persistence and memory cell formation. *Immunology & Cell Biology.* 2019;97(7):664–74.
60. Hollyman D, Stefanski J, Przybyłowski M, Bartido S, Borquez-Ojeda O, Taylor C, et al. Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy. *J Immunother.* 2009;32(2):169–80.
61. Fraietta JA, Lacey SF, Orlando EJ, Pruteanu-Malinici I, Gohil M, Lundh S, et al. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med.* 2018 May;24(5):563–71.
62. Sommermeyer D, Hudecek M, Kosasih PL, Gogishvili T, Maloney DG, Turtle CJ, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia.* 2016 Feb;30(2):492–500.
63. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999 Oct;401(6754):708–12.
64. Kishton RJ, Sukumar M, Restifo NP. Metabolic Regulation of T Cell Longevity and Function in Tumor Immunotherapy. *Cell Metabolism.* 2017 Jul 5;26(1):94–109.
65. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T-cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med.* 2011 Sep 18;17(10):1290–7.
66. Poorebrahim M, Melief J, Pico de Coaña Y, L. Wickström S, Cid-Arregui A, Kiessling R. Counteracting CAR T cell dysfunction. *Oncogene.* 2021 Jan;40(2):421–35.
67. Zhang DKY, Cheung AS, Mooney DJ. Activation and expansion of human T cells using artificial antigen-presenting cell scaffolds. *Nature Protocols.* 2020 Mar;15(3):773–98.
68. Akbar AN, Henson SM. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nat Rev Immunol.* 2011 Apr;11(4):289–95.

69. Fowler DH, Breglio J, Nagel G, Eckhaus MA, Gress RE. Allospecific CD8⁺ Tc1 and Tc2 populations in graft-versus-leukemia effect and graft-versus-host disease. *The Journal of Immunology*. 1996 Dec 1;157(11):4811–21.
70. Xu Y, Zhang M, Ramos CA, Durett A, Liu E, Dakhova O, et al. Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR.CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. *Blood*. 2014 Jun 12;123(24):3750–9.
71. Batra SA, Rathi P, Guo L, Courtney AN, Fleurence J, Balzeau J, et al. Glypican-3-Specific CAR T Cells Coexpressing IL15 and IL21 Have Superior Expansion and Antitumor Activity against Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Immunol Res*. 2020 Mar;8(3):309–20.
72. Oelke M, Krueger C, Giuntoli RL, Schneck JP. Artificial antigen-presenting cells: artificial solutions for real diseases. *Trends in Molecular Medicine*. 2005 Sep 1;11(9):412–20.
73. Neal LR, Bailey SR, Wyatt MM, Bowers JS, Majchrzak K, Nelson MH, et al. The Basics of Artificial Antigen Presenting Cells in T Cell-Based Cancer Immunotherapies. *J Immunol Res Ther*. 2017;2(1):68–79.
74. Wu D, Shou X, Zhang Y, Li Z, Wu G, Wu D, et al. Cell membrane-encapsulated magnetic nanoparticles for enhancing natural killer cell-mediated cancer immunotherapy. *Nanomedicine*. 2021 Feb;32:102333.
75. Benne N, van Duijn J, Kuiper J, Jiskoot W, Slütter B. Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines. *Journal of Controlled Release*. 2016 Jul 28;234:124–34.
76. Maus MV, Thomas AK, Leonard DGB, Allman D, Addya K, Schlienger K, et al. Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB. *Nat Biotechnol*. 2002 Feb;20(2):143–8.
77. Cheung AS, Zhang DKY, Koshy ST, Mooney DJ. Scaffolds that mimic antigen-presenting cells enable ex vivo expansion of primary T cells. *Nature Biotechnology*. 2018 Feb;36(2):160–9.
78. Shou X, Zhang H, Wu D, Zhong L, Ni D, Kong T, et al. Antigen-Presenting Hybrid Colloidal Crystal Clusters for Promoting T cells Expansion. *Small*. 2021;17(14):2006955.
79. Oelke M, Maus MV, Didiano D, June CH, Mackensen A, Schneck JP. Ex vivo induction and expansion of antigen-specific cytotoxic T cells by HLA-Ig-coated artificial antigen-presenting cells. *Nat Med*. 2003 May;9(5):619–24.
80. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 1989 Aug;8(2):98–101.
81. Maman S, Witz IP. A history of exploring cancer in context. *Nat Rev Cancer*. 2018 Jun;18(6):359–76.

82. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020 Feb 7;367(6478):eaau6977.
83. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
84. Emami Nejad A, Najafgholian S, Rostami A, Sistani A, Shojaeifar S, Esparvarinha M, et al. The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell International*. 2021 Jan 20;21(1):62.
85. Tormoen GW, Crittenden MR, Gough MJ. Role of the immunosuppressive microenvironment in immunotherapy. *Advances in Radiation Oncology*. 2018 Oct 1;3(4):520–6.
86. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2005 Nov;25(21):9543–53.
87. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr;9(4):239–52.
88. Xia Y, He J, Zhang H, Wang H, Tetz G, Maguire CA, et al. 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. *Molecular Oncology*. 2020;14(11):2920–35.
89. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun;9(6):654–9.
90. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2014 Jan;3(1):24641.
91. Lv L-H, Wan Y-L, Lin Y, Zhang W, Yang M, Li G-L, et al. Anticancer Drugs Cause Release of Exosomes with Heat Shock Proteins from Human Hepatocellular Carcinoma Cells That Elicit Effective Natural Killer Cell Antitumor Responses in Vitro. *J Biol Chem*. 2012 May 4;287(19):15874–85.
92. Lespagnol A, Duflaut D, Beekman C, Blanc L, Fiucci G, Marine J-C, et al. Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. *Cell Death Differ*. 2008 Nov;15(11):1723–33.
93. Brinton LT, Sloane HS, Kester M, Kelly KA. Formation and role of exosomes in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Feb;72(4):659–71.
94. Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, De Milito A, et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem*. 2009 Dec 4;284(49):34211–22.

95. Bebelman MP, Smit MJ, Pegtel DM, Baglio SR. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. 2018 Aug;188:1–11.
96. Czernek L, Döchler M. Functions of Cancer-Derived Extracellular Vesicles in Immunosuppression. *Arch Immunol Ther Exp*. 2017 Aug;65(4):311–23.
97. Barros FM, Carneiro F, Machado JC, Melo SA. Exosomes and Immune Response in Cancer: Friends or Foes? *Front Immunol*. 2018 Apr 11;9:730.
98. Aiello S, Rocchetta F, Longaretti L, Faravelli S, Todeschini M, Cassis L, et al. Extracellular vesicles derived from T regulatory cells suppress T cell proliferation and prolong allograft survival. *Sci Rep*. 2017 Dec;7(1):11518.
99. Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions. *Immunol Rev*. 2013 Jan;251(1):125–42.
100. Hurwitz SN, Rider MA, Bundy JL, Liu X, Singh RK, Meckes DG. Proteomic profiling of NCI-60 extracellular vesicles uncovers common protein cargo and cancer type-specific biomarkers. *Oncotarget*. 2016 Dec 27;7(52):86999–7015.
101. Haderk F, Schulz R, Iskar M, Cid LL, Worst T, Willmund KV, et al. Tumor-derived exosomes modulate PD-L1 expression in monocytes. *Sci Immunol*. 2017 Jul 28;2(13):eaah5509.
102. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009 Aug;9(8):581–93.
103. Greening DW, Gopal SK, Xu R, Simpson RJ, Chen W. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2015 Apr 1;40:72–81.
104. Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med*. 2013 Apr;91(4):431–7.
105. Kahlert C, Melo SA, Protopopov A, Tang J, Seth S, Koch M, et al. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem*. 2014 Feb 14;289(7):3869–75.
106. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol*. 2016 Apr;36(3):301–12.
107. Batagov AO, Kuznetsov VA, Kurochkin IV. Identification of nucleotide patterns enriched in secreted RNAs as putative cis-acting elements targeting them to exosome nano-vesicles. *BMC Genomics*. 2011 Nov 30;12 Suppl 3:S18.

108. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*. 2008 Feb 29;319(5867):1244–7.
109. Ghossoub R, Lembo F, Rubio A, Gaillard CB, Bouchet J, Vitale N, et al. Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat Commun*. 2014 May;5(1):3477.
110. Hoshino D, Kirkbride KC, Costello K, Clark ES, Sinha S, Grega-Larson N, et al. Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell Rep*. 2013 Dec 12;5(5):1159–68.
111. Kalra H, Drummen G, Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *IJMS*. 2016 Feb 6;17(2):170.
112. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci*. 2018 Jan;75(2):193–208.
113. Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, Brech A. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*. 2009 Jul;10(7):925–37.
114. Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T. Neutral Sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent Exosomal Transfer of Angiogenic MicroRNAs Regulate Cancer Cell Metastasis. *J Biol Chem*. 2013 Apr 12;288(15):10849–59.
115. Wollert T, Hurley JH. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*. 2010 Apr 8;464(7290):864–9.
116. Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends in Cell Biology*. 2017 Mar;27(3):172–88.
117. Ukrainskaya VM, M YB, Rubtsov YP, П ПЮ, Knorre VD, Д KB, et al. The Role of Tumor-Derived Vesicles in the Regulation of Antitumor Immunity. *Acta Naturae*. 2019 Dec 15;11(4):33–41.
118. Ukrainskaya VM, M YB, Stepanov AV, B CA, Glagoleva IS, C ГИ, et al. Death Receptors: New Opportunities in Cancer Therapy. *Acta Naturae*. 2017 Sep 15;9(3):55–63.
119. Martínez-Lorenzo MJ, Anel A, Alava MA, Piñeiro A, Naval J, Lasierra P, et al. The human melanoma cell line MelJuSo secretes bioactive FasL and APO2L/TRAIL on the surface of microvesicles. Possible contribution to tumor counterattack. *Exp Cell Res*. 2004 May 1;295(2):315–29.
120. Wieckowski E, Whiteside TL. Human tumor-derived vs dendritic cell-derived exosomes have distinct biologic roles and molecular profiles. *Immunol Res*. 2006;36(1–3):247–54.

121. Klibi J, Niki T, Riedel A, Pioche-Durieu C, Souquere S, Rubinstein E, et al. Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood*. 2009 Feb 26;113(9):1957–66.
122. Setroikromo R, Zhang B, Reis CR, Mistry RH, Quax WJ. Death Receptor 5 Displayed on Extracellular Vesicles Decreases TRAIL Sensitivity of Colon Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol*. 2020 May 19;8:318.
123. Taylor DD, Lyons KS, Stanson J, Whiteside TL. T-Cell Apoptosis and Suppression of T-Cell Receptor/CD3- ζ by Fas Ligand-Containing Membrane Vesicles Shed from Ovarian Tumors. :8.
124. Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, Raulet DH. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity*. 2002 Jul;17(1):19–29.
125. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*. 2005 Aug 25;436(7054):1186–90.
126. Li J, Tian T, Zhou X. The role of exosomal shuttle RNA (esRNA) in lymphoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2019 May;137:27–34.
127. Strauss L, Bergmann C, Whiteside TL. Human circulating CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells kill autologous CD8⁺ but not CD4⁺ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol*. 2009 Feb 1;182(3):1469–80.
128. Szajnik M, Czystowska M, Szczepanski MJ, Mandapathil M, Whiteside TL. Tumor-Derived Microvesicles Induce, Expand and Up-Regulate Biological Activities of Human Regulatory T Cells (Treg). Unutmaz D, editor. *PLoS ONE*. 2010 Jul 22;5(7):e11469.
129. Czystowska M, Strauss L, Bergmann C, Szajnik M, Rabinowich H, Whiteside TL. Reciprocal granzyme/perforin-mediated death of human regulatory and responder T cells is regulated by interleukin-2 (IL-2). *J Mol Med (Berl)*. 2010 Jun;88(6):577–88.
130. Charbonneau B, Moysich KB, Kalli KR, Oberg AL, Vierkant RA, Fogarty ZC, et al. Large-Scale Evaluation of Common Variation in Regulatory T Cell-Related Genes and Ovarian Cancer Outcome. *Cancer Immunology Research*. 2014 Apr 1;2(4):332–40.
131. Duan M-C, Zhong X-N, Liu G-N, Wei J-R. The Treg/Th17 paradigm in lung cancer. *J Immunol Res*. 2014;2014:730380.
132. Zhou J, Li X, Wu X, Zhang T, Zhu Q, Wang X, et al. Exosomes Released from Tumor-Associated Macrophages Transfer miRNAs That Induce a Treg/Th17 Cell Imbalance in Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Immunol Res*. 2018;6(12):1578–92.
133. Zheng Y, Wang Z, Deng L, Zhang G, Yuan X, Huang L, et al. Modulation of STAT3 and STAT5 activity rectifies the imbalance of Th17 and Treg cells in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol*. 2015 Mar;157(1):65–77.

134. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin J-P, et al. Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest.* 2010 Feb;120(2):457–71.
135. Muller L, Mitsuhashi M, Simms P, Gooding WE, Whiteside TL. Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell subsets. *Sci Rep.* 2016 Apr;6(1):20254.
136. Sprent J. Direct stimulation of naïve T cells by antigen-presenting cell vesicles. *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* 2005 Jul;35(1):17–20.
137. Chen L, Hasni MS, Jondal M, Yakimchuk K. Modification of anti-tumor immunity by tolerogenic dendritic cells. *Autoimmunity.* 2017 Aug 18;50(6):370–6.
138. Guery L, Hugues S. Tolerogenic and Activatory Plasmacytoid Dendritic Cells in Autoimmunity. *Frontiers in Immunology.* 2013;4:59.
139. Wiklander OPB, Brennan MÁ, Lötval J, Breakefield XO, El Andaloussi S. Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Sci Transl Med.* 2019 May 15;11(492):eaav8521.
140. Silachev DN, Goryunov KV, Shpilyuk MA, Beznoschenko OS, Morozova NY, Kraevaya EE, et al. Effect of MSCs and MSC-Derived Extracellular Vesicles on Human Blood Coagulation. *Cells.* 2019 Mar 19;8(3):258.
141. Semina SE, Scherbakov AM, Vnukova AA, Bagrov DV, Evtushenko EG, Safronova VM, et al. Exosome-Mediated Transfer of Cancer Cell Resistance to Antiestrogen Drugs. *Molecules.* 2018 Apr 4;23(4):829.
142. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013 Nov;8(11):2281–308.
143. Concordet J-P, Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jul 2;46(W1):W242–5.
144. Hikita T, Miyata M, Watanabe R, Oneyama C. Sensitive and rapid quantification of exosomes by fusing luciferase to exosome marker proteins. *Sci Rep.* 2018 Dec;8(1):14035.
145. Navarro-Tableros V, Gomez Y, Camussi G, Brizzi MF. Extracellular Vesicles: New Players in Lymphomas. *IJMS.* 2018 Dec 21;20(1):41.
146. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology.* 2006 Mar;30(1):3.22.1-3.22.29.

147. De Oliveira SN, Wang J, Ryan C, Morrison SL, Kohn DB, Hollis RP. A CD19/Fc fusion protein for detection of anti-CD19 chimeric antigen receptors. *J Transl Med.* 2013 Jan 29;11:23.
148. Pick H, Schmid EL, Tairi A-P, Ilegems E, Hovius R, Vogel H. Investigating cellular signaling reactions in single attoliter vesicles. *J Am Chem Soc.* 2005 Mar 9;127(9):2908–12.
149. Oshchepkova A, Neumestova A, Matveeva V, Artemyeva L, Morozova K, Kiseleva E, et al. Cytochalasin-B-Inducible Nanovesicle Mimics of Natural Extracellular Vesicles That Are Capable of Nucleic Acid Transfer. *Micromachines.* 2019 Nov;10(11):750.
150. Theodoropoulos PA, Gravanis A, Tsapara A, Margioris AN, Papadogiorgaki E, Galanopoulos V, et al. Cytochalasin B may shorten actin filaments by a mechanism independent of barbed end capping. *Biochem Pharmacol.* 1994 May 18;47(10):1875–81.
151. Gomzikova MO, Zhuravleva MN, Miftakhova RR, Arkhipova SS, Evtugin VG, Khaiboullina SF, et al. Cytochalasin B-induced membrane vesicles convey angiogenic activity of parental cells. *Oncotarget.* 2017 Jul 31;8(41):70496–507.
152. Xie J, Sok D, Wu NC, Zheng T, Zhang W, Burton DR, et al. Immunochemical engineering of cell surfaces to generate virus resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017 02;114(18):4655–60.
153. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.
154. Dewez B, Lans M, Allaey V, Karaoglou A, Taper H, Roberfroid M. Serum alkaline deoxyribonuclease activity, a sensitive marker for the therapeutic monitoring of cancer patients: methodological aspects. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1993 Nov;31(11):793–7.
155. Patel PS, Patel BP, Rawal RM, Raval GN, Patel MM, Patel JB, et al. Evaluation of serum alkaline DNase activity in treatment monitoring of head and neck cancer patients. *Tumour Biol.* 2000 Apr;21(2):82–9.
156. Alekseeva LA, Sen'kova AV, Zenkova MA, Mironova NL. Targeting Circulating SINEs and LINEs with DNase I Provides Metastases Inhibition in Experimental Tumor Models. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2020 Jun 5;20:50–61.
157. Lazarides E, Lindberg U. Actin is the naturally occurring inhibitor of deoxyribonuclease I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974 Dec;71(12):4742–6.
158. Zinn E, Pacouret S, Khaychuk V, Turunen HT, Carvalho LS, Andres-Mateos E, et al. In Silico Reconstruction of the Viral Evolutionary Lineage Yields a Potent Gene Therapy Vector. *Cell Rep.* 2015 Aug 11;12(6):1056–68.

5. ПРИЛОЖЕНИЕ

5.1. Приложение 1. Таблица 3. Антитела, использованные в работе

	Наименование антитела	Производитель, cat.	Клон
1	Anti-human CD3-APC/Cy7	Biolegend, 344817	SK7
3	anti-human CD19-PE	Miltenyi, 130-113-733	LT19
4	anti-human CD63-APC	Sony, 2365035	H5C6
5	anti-human CD19-HRP	Biorad, MCA1940GA	LT19
6	rabbit anti-human GAPDH	Sigma, G9545-100UL	поли
7	donkey anti-rabbit-HRP	Sigma, AP182P	поли
8	anti-human CD63 biotin	Sony, 2365085	H5C6
9	goat anti-human IgG, DyLight650	TF, SA5-10137	поли
10	anti-human IL13R2A-FITC	RnD, FAB614F	поли
11	anti-human CD81 (TAPA-1) APC	Sony, 2347550	5A6
12	anti-human Ly6G-APC	Biolegend, 127613	1A8
13	Streptavidin-HRP	Biorad, STAR5B	поли
14	anti-human CD45-APC-Cy7	BD Pharmagin, 561864	HI30
15	anti-human CD4-APC	Biolegend, 317415	ОКТ4
16	anti-human CD8-PE	Biolegend, 980902	SK1
17	anti-huma CD107a-PE	BD, 560948	H4A3
18	CD19-Fc-FITC	Acro Biosystems, CD9-HF251	-
19	anti-human CD45RA-PE	Biolegend, 304107	HI100
20	anti-human CD62L-APC	Biolegend, 304809	DREG-56
21	anti-human CD57-PE-Cy7	Miltenyi, 130-111-810	REA769
22	anti-human TIGIT-PE-Cy7	Miltenyi, 130-116-814	REA1004
23	anti-human PD-1-APC	Miltenyi, 130-117-384	PD1.3.1.3
24	anti-human CD33-PE	Miltenyi, 130-113-349	AC104.3E3
25	anti-human CD123-APC	Miltenyi, 130-113-326	AC145
26	anti-Her2-APC	Abcam, ab16901	3B5
27	Cross-absorbed Ab-APC-Cy7	Biolegend, 405316	Poly4053
28	anti-human CD11b-PE	Biolegend, 301405	CBRM1/5

5.2. Приложение 2. Таблица 4. Получение генетических конструкций и использованные праймеры и рестриктазы.

Название	Последовательность	Клонирование	Сайты рестрикции
dTomato-MTA-FW	GGGCCTCGGGGGCCTGGCTAGCGGCTC CACCAGCGGCAGCGG	pLV2-dTomato-MTA	EcoRI/NheI
dTomato-MTA-REV	CCGCTGCCGCTGGTGGAGCCGCTAGCCA GGCCCCGAGGCC		
IL13-FW	TTATTGAATTCGGCTCCTGTGCCTCCCTC TACAGCCCTCA	pLV3-IL13R2a	EcoRI/NheI
IL13-REV	TTATGCTAGCGTTGAACTGTCCCTCGCG AAAAAGTTTCTTTAAATGTAAGAGC		
HER2-REV	TATGTCGACTCACACTGGCACGTCCAGA CC	pLV3-Her2	XbaI/BamHI
HER2-FW	TATTCTAGAGCCACCATGGAGCTGG		
PLV2-REV	GAATACCAGTCAATCTTTCA	Праймеры для сиквенирования	
LV2-EF1A-FW	GGTGTCGTGAACACGTGGTTCG		
PLV2-REV	ATCCACATAGCGTAAAAGGAGCAACAT AG		
EF1A-FW-	TCATTCTCAAGCCTCAGACAG		
CD33-FW	GACTCACACTGGCACGTCCAGACC	pLV3-CD33	XbaI/SphI
CD33-REV	GCCTCGGGGGCCTGGCTAGCG		
CD123-FW	CAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTA TTACCATGGT	pLV3-CD123	XbaI/SphI
CD123-REV	CACGAATTCGCAGGTTTCAGCTGGTGGAA TCAGG		
CD19-FW	TATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTC	pLV2-CD19-CAR	XbaI/BamHI
CAR-REV	CTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGAT		
IL2-FW	CATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGC	pLV2-IL13-CAR	XbaI/BamHI
CAR-REV	CTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGAT		
CD63FW	CACCATGGCGGTGGAAGGAGGAATGAA ATGTGTGAAG	pLV2-CD63-GFP	EcoRI/NheI

CD63REV	GGCTGTGCGAACGCATTCTGGCGTAATA GGGATCCGTTA		
CD63 FW	CACCATGGCGGTGGAAGGAGGAATGAA ATGTGTGAAG	pCDH115-CD63- nanoluc	EcoRI/NheI
nluc REV	GGGGGCTGGCTGAGGAAAAATGTGCTG G		
Ffluc FW	ATCGAAAAAATTTTTAAGGTGGTGTACC CTGTGGA	pCDH115-ffluc	EcoRI/NheI
Ffluc REV	TGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCT		
IL2-FW	CATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGC	pIV2-CD33- CAR	XbaI/BamHI
CAR-REV	CTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGAT		
IL2-FW	CATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGC	pIV2-CD123- CAR	XbaI/BamHI
CAR-REV	CTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGAT		