

Калинин Роман Сергеевич

**КОМБИНАТОРНЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ СПЕЦИФИЧЕСКИХ
ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ Т-КЛЕТОК И МЕТОДЫ
РЕГУЛИРОВАНИЯ ИХ АКТИВНОСТИ**

1.5.3. Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2022

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

Научный руководитель:

Степанов Алексей Вячеславович, кандидат биологических наук-

Официальные оппоненты:

Яшин Денис Владимирович, д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммуногенетики рака, ФБГУН Институт биологии гена Российской академии наук;

Друцкая Марина Сергеевна, к.б.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория молекулярных механизмов иммунитета, Института молекулярной биологии имени В.А.Энгельгардта.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

Защита состоится 22 февраля 2023 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва В-437, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

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

Автореферат разослан « »

202... года.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



Олейников В.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В течение последних десятилетий во всем мире отмечается стабильный рост количества пациентов с онкологическими заболеваниями. Современные методы лечения – химиотерапия, лучевая терапия, оперативное лечение, не всегда способствуют полной регрессии болезни. Терапия Т-клетками, модифицированными химерным антигенным рецептором (CAR-T), изменила многие аспекты клинической и трансляционной онкологии, а значительные успехи привели к быстрому расширению клинических и фундаментальных научных исследований в этой области. Однако, несмотря на несомненные успехи новой терапии, при ее применении были зарегистрированы существенные побочные эффекты. К примеру, при лечении диффузных гематологических злокачественных новообразований, нередко, на фоне осложнений, связанных с неконтролируемой гиперактивацией и неспецифической цитотоксичностью, у пациента возрастает риск развития побочных явлений, опасных для жизни – цитокиновый шторм и синдром лизиса опухоли. Помимо этого, эффективность CAR-T терапии подавляется иммуносупрессивным микроокружением опухоли. Поэтому для широкого применения CAR-T терапии необходимо преодолеть такие проблемы как: гетерогенность солидных опухолей, сложность поиска антигенов-мишеней, иммуносупрессивное действие опухолевого микроокружения, а также создать методы, позволяющие контролировать активность CAR-T клеток.

Цель работы и основные задачи исследования. Целью данной работы является создание новых методов и подходов для повышения уровня эффективности и безопасности CAR-T терапии в лечении онкологических заболеваний. Для этого были поставлены следующие задачи:

- создание аутокринной системы отбора лигандов, селективных для В-клеточного рецептора пациента, встраиваемого в структуру CAR;
- проверка полученных CAR на модели В-клеточной лимфомы *ex vivo* и *in vivo*;
- создание генно-инженерных конструкций, кодирующих блокаторы экспрессии PD-1;

- анализ эффекта подавления экспрессии PD-1 на функциональную активность CAR-T клеток *in vitro*;
- создание и функциональный анализ молекул-посредников, содержащих барназу, и CAR, содержащих барстар;
- определение терапевтического потенциала модульной системы на основе взаимодействия барназа-барстар *in vivo*.

Научная новизна и практическая значимость работы. В представленной работе впервые разработан метод аутокринной селекции направляющего пептида из пептидной библиотеки для CAR против В-клеточной лимфомы. Получаемые CAR-T клетки элиминируют опухолевые клоны как *ex vivo*, так и *in vivo* также эффективно, как и хорошо известный CAR, нацеленный на CD19. Время создания персонализированной популяции CAR-T клеток сопоставимо с классической CAR19 терапией. Отличная от CD19 мишень может понадобиться, когда CD19 отсутствует или подавляется, что может происходить у значительной части пациентов.

Также впервые показано, что однодоменное антитело верблюжьих 102с3, специфичное к PD-1, может быть использовано для эффективного блокирования экспрессии PD-1. Данный подход позволяет изменять паттерн мембранных белков, не прибегая к геномному редактированию клеток. В нашем исследовании в экспериментах *in vitro* было показано, что блокировка негативной передачи сигнала приводит к гиперактивации CAR-T клеток и дальнейшему ухудшению выживаемости. Это указывает на важность соблюдения баланса положительных и отрицательных сигналов на функциональность CAR-T клеток.

Была создана уникальная система регуляции активности CAR-T клеток на основе взаимодействия барназы с барстаром. Было показано, что система регулируется *in vitro* и функционально активна *in vivo*.

Публикации и апробация работы. По теме работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК. Основные результаты диссертационной работы были представлены на семи конференциях.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список сокращений и список литературы. Материал иллюстрирован 40 рисунками и 6 таблицами. Библиографический указатель включает ссылки на 255 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Аутокринный отбор направляющего пептида для персонализированной CAR-T терапии В-клеточных лимфом

Для безопасного применения адаптивной иммунотерапии необходимо индивидуально распознавать опухолевые антигены в условиях ограниченного арсенала антител. В случае лимфомы уже существует уникальный опухолеспецифичный антиген – В-клеточный рецептор. Его можно использовать как антиген для нацеливания CAR-T клеток. Разработанная нами аутокринная система отбора пептидов, селективных для В-клеточного рецептора, встраиваемых в структуру распознающего домена CAR (схема метода представлена и описана на рисунке 1), позволит приблизить персонализированную терапию к практике.

В проведенном исследовании для определения нуклеотидной последовательности В-клеточных рецепторов из злокачественных клеток использовали биопсии из лимфатических узлов от трех пациентов с фолликулярной лимфомой (ФЛ). С помощью кДНК, полученной в ходе обратной транскрипции тотальной мРНК, были амплифицированы гены переменных частей иммуноглобулина (Ig)-V. 95% проанализированных последовательностей были идентичны, поскольку лимфома имеет клональную природу. Выбранные переменные области Ig клонировали в вектор pComb3X в формате одноцепочечного переменного фрагмента (scFv) аналогично исследованию, выполненному под руководством Ричарда Лернера.

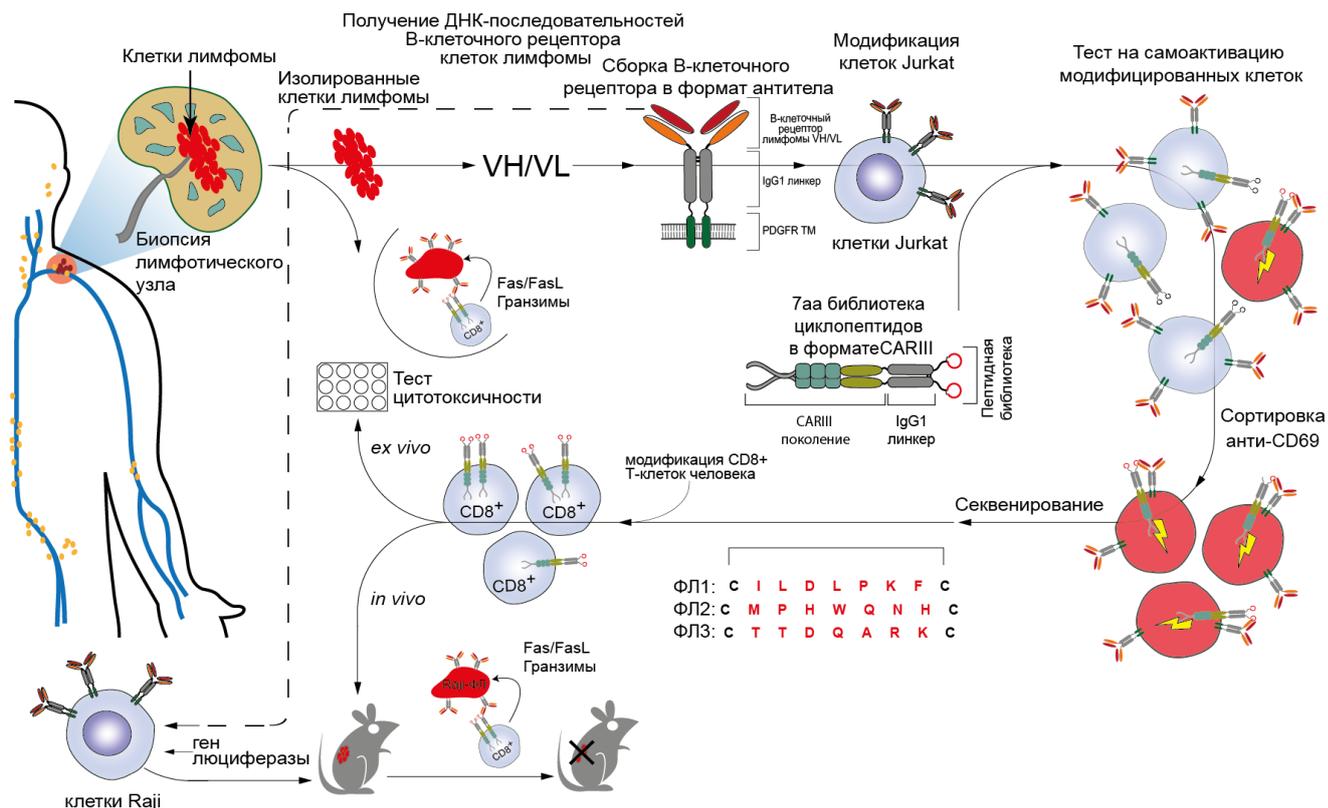


Рисунок 1 – Схематическое изображение аутокринного отбора распознающей части CAR в формате пептида для персонализированной CAR-T терапии.

Гены В-клеточных рецепторов из биопсии лимфатического узла от пациента с фолликулярной лимфомой (ФЛ) клонируются в виде мембраносвязанных В-клеточных рецепторов (мембранный домен из рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFR)). Они коэкспрессируются с библиотекой циклопептидов в составе CAR на поверхности клеточной линии Jurkat. В такой клеточной репортерной системе отбираются пептиды, нацеленные на В-клеточные рецепторы. После нескольких раундов отбора активировавшихся клеток Jurkat выбранные пептиды, слитые с CAR, секвенируются и могут быть немедленно использованы для получения терапевтических Т-лимфоцитов, модифицированные опухолеспецифическим CAR. Полученные CAR-T клетки тестируются на способность элиминировать опухолевые клетки *in vivo* на иммунодефицитных мышах или *in vitro* с использованием модельных клеток Raji, которые модифицированы мембраносвязанными В-клеточными рецепторами. VH – варибельная область тяжелой цепи Ig; VL – варибельная область легкой цепи Ig

Таким образом, scFv, слитый с константным доменом антитела (Fc) и связанный через гибкий линкер с трансмембранным доменом PDGFR, интегрируется в виде димера в мембрану клетки (Рисунок 2А правая сторона).

Аутокринная репортерная система позволяет осуществлять прямой отбор определенного пептида, который можно использовать для нацеливания CAR против опухолевых клеток пациента (Рисунок 2). В этой системе используется клеточная линия человеческих Т-лимфоцитов – Jurkat. Клетки Jurkat трансдуцируются

лентивирусами с нуклеотидной последовательностью восстановленного В-клеточного рецептора с мембраносвязывающим доменом и лентивирусами с нуклеотидной последовательностью комбинаторной библиотеки, с представительностью 10^9 разных последовательностей циклопептидов из семи аминокислот.

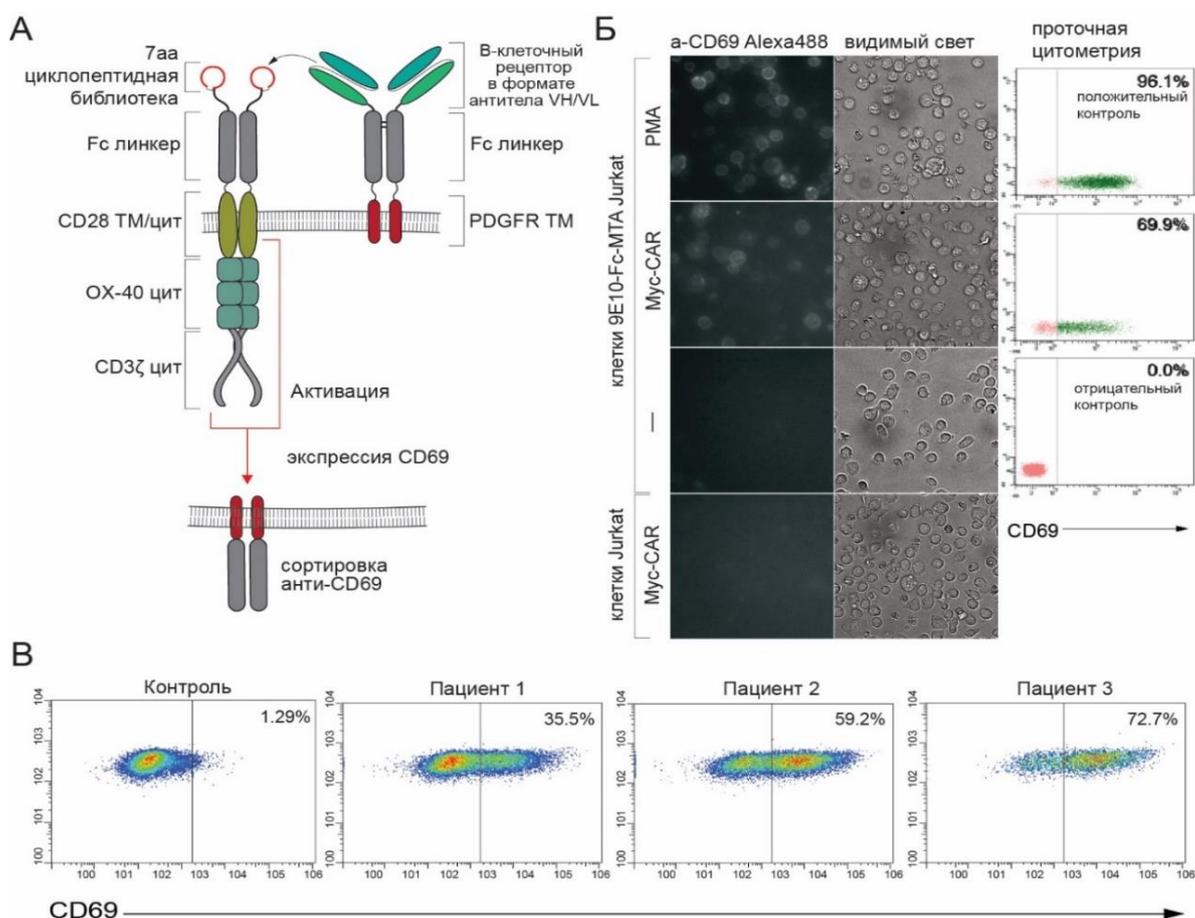


Рисунок 2 – Аутокринный отбор циклопептидов слитых с CAR к В-клеточному рецептору опухолевых В-клеток. А) Схематическое изображение репортерной системы. PDGFR TM – трансмембранная часть рецептора тромбоцитарного фактора роста. Б) Проверка репортерной системы с помощью взаимодействия пары с-Мус (пептид)-CAR/антитело против с-Мус. Для положительного контроля клетки обрабатывались PMA – форбол-12-миристат-13-ацетат, который активирует Т-клетки. В) Пептид в составе CAR, специфичный к В-клеточному рецептору пациента, активирует репортерные клетки Jurkat

После трансдукции модифицированные клетки несут на своей поверхности библиотеку циклопептидов, соединенную с CAR, и восстановленный заякоренный в мембране В-клеточный рецептор (Рисунок 2А). Когда scFv В-клеточного рецептора взаимодействует с пептидом из библиотеки циклопептидов, сигнальные домены

CAR запускают каскад активации Т-клеток. Активированные Т-клетки начинают экспрессировать CD69 (антиген ранней активации Т-клеток). Предварительно была подтверждена работоспособность репортерной системы на модели, в которой использовали известный с-Мус эпитоп, как пептид в составе CAR, а переменные домены антитела анти Мус (клон 9E10) – в качестве образца мембраносвязанного В-клеточного рецептора (Рисунок 2Б). На основании полученных результатов на модельной системе Мус был выполнен дальнейший аутокринный отбор пептидов в составе CAR для В-клеточного рецептора от пациентов с лимфомой (Рисунок 2В). Провели несколько раундов селекции, в результате которых были обнаружены три циклопептида CILDLPKFC (ФЛ1), CMPHWQNHС (ФЛ2) и СТТDQARKС (ФЛ3), которые специфичны для scFv В-клеточных рецепторов, идентифицированных у трех пациентов. Специфичность найденных пептидов к растворимой форме В-клеточного рецептора в формате рекомбинантного антитела была доказана ИФА и методом поверхностного плазмонного резонанса.

Специфическая цитотоксичность CAR-Т клеток в отношении клеток лимфомы

На следующем этапе экспериментов была подтверждена специфическая цитотоксичность Т-клеток, трансдуцированных полученными конструкциями ФЛ1-CAR, ФЛ2-CAR и ФЛ3-CAR, против клеточных линий Raji, модифицированных В-клеточными рецепторами пациентов в формате заякоренного антитела, *in vitro*. Экспрессия В-клеточного рецептора на поверхности клеток Raji была подтверждена путем окрашивания антителом против Fc, а также окрашиванием биотинилированными пептидами ФЛ1, ФЛ2 и ФЛ3 и последующим вторичным окрашиванием пептидов флуоресцентно меченым стрептавидином (FITC). Для цитотоксического теста смешивали Т-лимфоциты, экспрессирующие ФЛ1-CAR, ФЛ2-CAR, ФЛ3-CAR, а для положительного контроля – анти CD19-CAR (CAR19) с клетками Raji, которые несут В-клеточный рецептор пациентов (Raji-ФЛ1, Raji-ФЛ2 и Raji-ФЛ3). Лизис таргетных клеток определяли по высвобождению внутриклеточной лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (Рисунок 3А). Специфическая цитотоксичность ФЛ1-CAR-Т, ФЛ2-CAR-Т и ФЛ3-CAR-Т клеток была сравнима с

CAR19-T клетками. Далее была проведена оценка цитотоксичности ФЛ1-CAR-T клеток против клеток из исходной биопсии пациента 1 *ex vivo*. Более 60% клеток в образце биопсии представляют собой В-клетки, специфичные к пептиду ФЛ1 (Рисунок 3Б). Анализ цитотоксичности показал, что ФЛ1-CAR-T клетки специфически лизировали клетки из образца биопсии, в то время как Мус-CAR и контрольные Т-клетки не обладали какой-либо противоопухолевой активностью (Рисунок 3В).

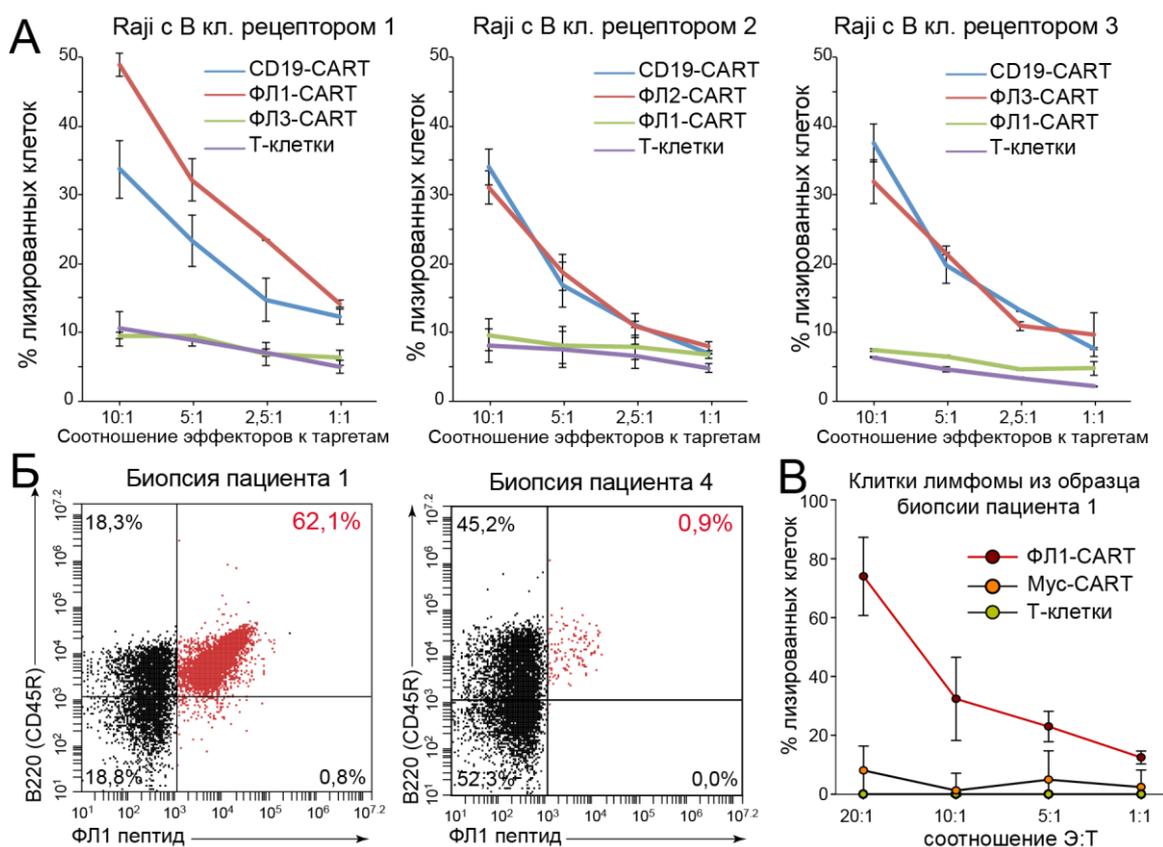


Рисунок 3 – Отобранные пептиды специфически взаимодействуют с В-клеточным рецептором и перенаправляют CAR-T клетки на уничтожение опухолевых клеток. А) ФЛ1-CAR-T клетки были икубированы с клетками Raji, трансдуцированными восстановленными В-клеточными рецепторами. В качестве сравнения использовались нетрансдуцированные Т-клетки и CAR19-T клетки. Цитотоксичность определяли путем измерения высвобождения ЛДГ через 6 ч сокультивации. Б) Клетки из биопсии пациентов с фолликулярной лимфомой окрашивались синтетическим биотинилированным пептидом ФЛ1. Популяцию В-клеток идентифицировали с помощью B220-специфического антитела анти CD45R. Пептид ФЛ1, специфичный к В-клеточному рецептору, меченый биотином, обнаруживали с помощью стрептавидина, меченого флуоресцеинизотиоцианатом (FITC). В) Лизис В-клеток, полученных из образца биопсии лимфомы пациента 1, клетками ФЛ1-CAR-T, в сравнении с лизисом Мус-CAR-T и контрольными Т-клетками

ФЛ1-CAR-T клетки эффективны против клеток лимфомы *in vivo*

Эффективность ФЛ1-CAR-T клеток была протестирована на модели фолликулярной лимфомы с использованием иммунодефицитных мышей (SCID; CB17-Prkdc^{scid}/NcrCrl)). Животным вводили подкожно в левый бок 5×10^6 клеток Raji с ФЛ1-B-клеточным рецептором (Raji-ФЛ1; Рисунок 4А). Инъекция 5×10^6 ФЛ1-CAR-T или CAR19-T клеток значительно снижала опухолевую нагрузку и улучшала выживаемость мышей по сравнению с контрольными группами, которым вводили Мус-CAR-T клетки (Рисунок 4В и 4Г). На 37-й день 100% мышей из контрольной группы Мус-CAR были мертвы, в отличие от 80% выживших в группах ФЛ1-CAR и CAR19 (Рисунок 4В). С применением проточной флуориметрии было выявлено, что CAR-T клетки сохраняются в периферической крови через 21 день после инфузии (Рисунок 4Г, вставка). Как и ожидалось, экспансия CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих CAR, коррелировала с экспрессией поверхностных маркеров, связанных с эффекторными фенотипами (Рисунок 4Д). Популяция ФЛ1-CAR в периферической крови состояла из эффекторных клеток памяти, тогда как селезенка и костный мозг были заселены центральными клетками памяти (Рисунок 4Е). Эти клетки играют важную роль в персистенции и устойчивой противоопухолевой активности.

Таким образом, аутокринный метод селекции, представленный в работе, позволяет отбирать направляющие циклопептиды для персонализированной CAR-T терапии В-клеточной лимфомы. Кроме того, было установлено, что Т-клетки, модифицированные отобранными пептидами из библиотеки, слитые с CAR, элиминируют опухолевые клетки как *ex vivo*, так и *in vivo* также эффективно, как и хорошо известный CAR, нацеленный на CD19. Одним из преимуществ данного отбора является то, что при селекции распознающей части CAR опухолевый антиген – пептиды уже находятся в конструкции CAR. Обычно в клетках, несущих CAR, направленность определяется антителом, а мишенью является антиген опухолевой клетки. В работе предлагается использовать обратный принцип, когда специфичность CAR-T определяется пептидом, а мишенью является антитело.

Наконец, нами обнаружена мишень для CAR-T клеток, отличная от CD19, которая не только расширяет выбор специфичных CAR, но также может использоваться, когда CD19 отсутствует или его экспрессия подавляется, что может происходить у значительной части пациентов.

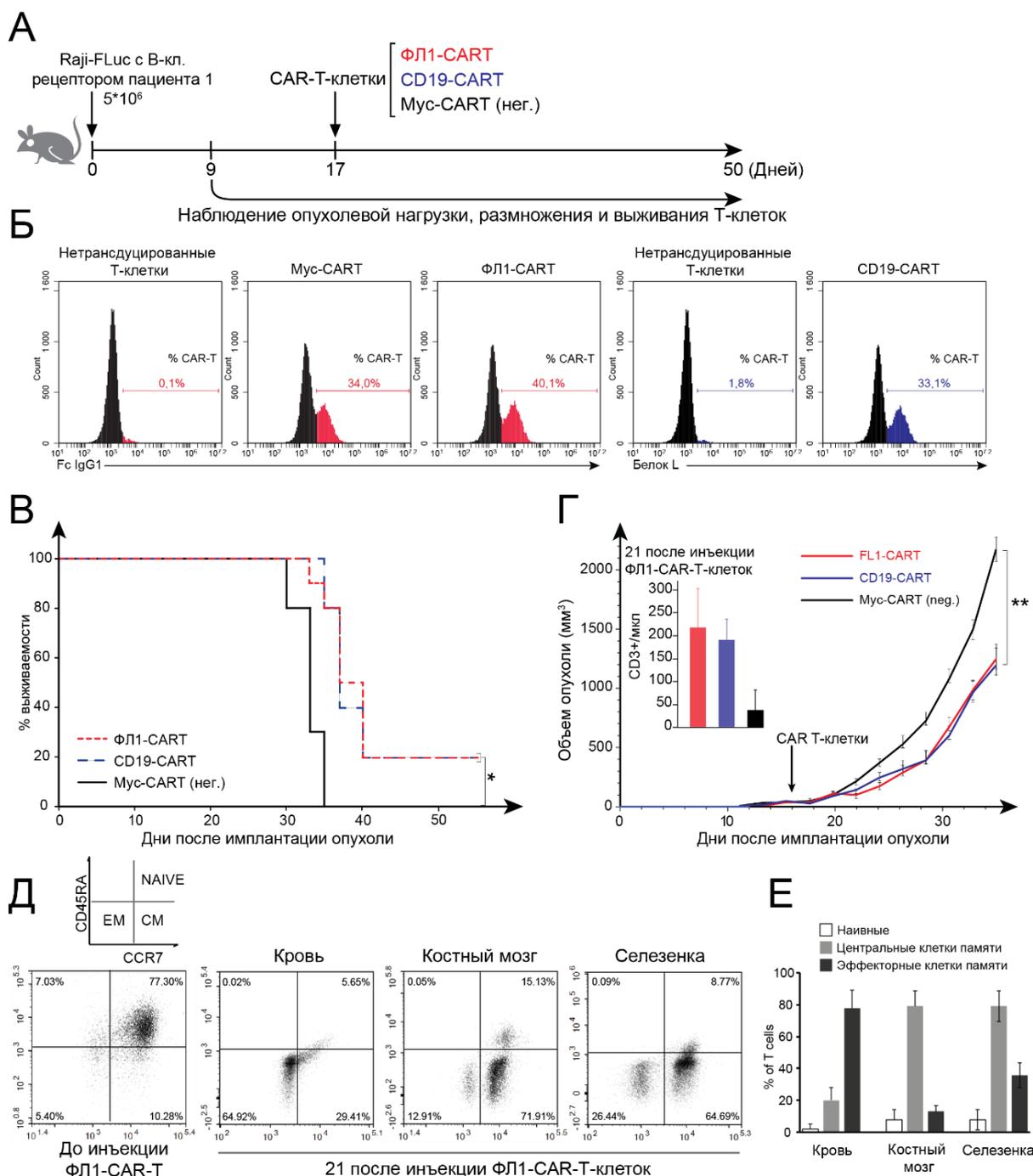


Рисунок 4 – ФЛ1-CAR-T клетки подавляют лимфомагенез *in vivo*. А) Схема эксперимента. Мышам NOD SCID прививали 5×10^6 клеток Raji-ФЛ1 с B-клеточным рецептором пациента 1 в формате мембранного scFv. На 15-й день животных рандомизировали по группам (по 12 мышей в группе) в соответствии с объемом опухоли. На 17-й день мышам внутривенно вводили 3×10^6 ФЛ1-CAR-T, CAR19-T

или Мус-CAR-T клеток. Б) Оценка эффективности трансдукции активированных CD8 + Т-клеток человека лентивирусными векторами: ФЛ1-CAR, Мус-CAR и CAR19 перед введением. Клетки окрашивали IgG1-специфическим антителом или белком L. В) Выживаемость мышей, привитых клетками Raji-ФЛ1, с введенными на 17-й день CAR-T (3×10^6 клеток) (в группе, n=12). Кривые общей выживаемости строили по методу Каплана-Мейера и сравнивали с помощью логарифмического критерия (Мантела-Кокса) (* P <0,01). Г) Динамика роста опухоли в группах животных (n = 12), которым вводили 3×10^6 ФЛ1-CAR-T, CAR19-T или Мус-CAR-T клеток (** P <0,05, непарный t – критерий Стьюдента). Гистограмма количества адоптивно перенесенных модифицированных Т-клеток в крови на 21-й день после инъекции. Окрашивание клеток было проведено с использованием специфических антител анти CD3 человека из ретроорбитальной пункции. Д) Проточный флуороцитометрический анализ фенотипа ФЛ1-CAR-T клеток у мыши перед инъекцией и на 21-й день после инъекции. Е) Относительный процент наивных, центральных клеток памяти (СМ) и эффекторных клеток памяти (ЕМ) на 21-й день после инъекции ФЛ1-CAR-T клеток.

Блокирование PD-1 Т-клеток для преодоления иммуносупрессорного микроокружения опухоли

Для изучения влияния передачи сигналов PD-1/PD-L1 на активность и выживаемость CAR-T клеток была создана модельная система с использованием Т-клеточной линии Jurkat NFAT Lucia™ (Jurkat). Были сконструированы и созданы рекомбинантные векторы, кодирующие CAR19 и наноантитело анти PD-1, слитое с шарнирами Fc или (G₄S)₃ и трансмембранным доменом (aPD-1-Fc-MTA или aPD-1-GS-MTA), CAR19, через последовательность саморазрезающегося пептида P2A, слитый с aPD-1-PEBL (последовательность для внутриклеточной блокировки) (CAR19-P2A-aPD1(VNH)-PEBL). Для создания репортерной клеточной системы были получены Jurkat PD-1, которые параллельно с клетками Jurkat были трансдуцированы aPD1-Fc-MTA, aPD1-GS-MTA и CAR19-P2A-aPD1-PEBL (Рисунок 5). Было показано, что все три конструкции приводят к снижению PD-1. Однако нельзя исключать, что PD-1 остается на мембране, а детекция антителами блокируется из-за параллельного взаимодействия PD-1 с анти-PD-1 VNH. Клетки Jurkat PD-1 с мембранозаякоренным наноантителом анти-PD-1 (aPD1-Fc-MTA, aPD1-GS-MTA) имели низкую выживаемость. Полученный результат мог быть вызван потерей передачи сигнала через PD-1, защищающий от гиперактивации Т-клеток, или дополнительной передачей сигнала из-за связывания наноантитела с PD-1. Низкая выживаемость Jurkat с мембранным VNH анти-PD-1 обусловила дальнейшее проведение экспериментов на Jurkat с CAR19-P2A-aPD-1-PEBL.

Для функционального теста были использованы Jurkat и Jurkat PD-1 с CAR19 или с CAR19-P2A-aPD-1-PEBL. В качестве клеток-мишеней использовали CD19 положительную линию лимфоных В-клеток Nalm-6 и Nalm-6 PD-L1. Взаимодействие PD-1/PD-L1 приводит к снижению активности промотора NFAT. В качестве промотора NFAT применяли секретируемый вариант люциферазы светлячка, по активности которой можно количественно оценить активацию CAR (Рисунок 6А).

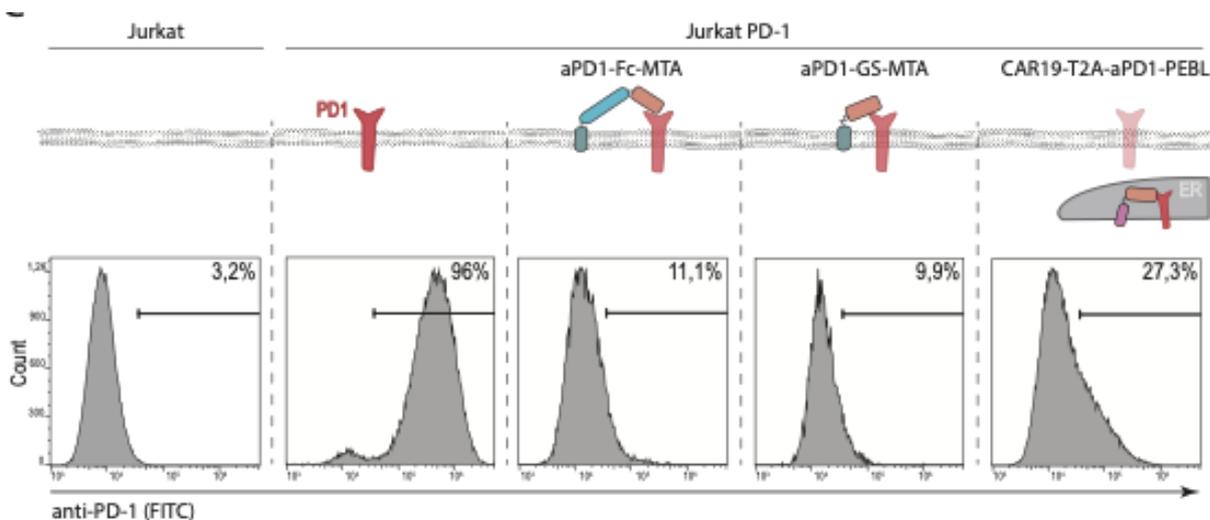


Рисунок 5 – Анализ экспрессии PD-1 клетками Jurkat PD-1 после трансдукции лентивирусными конструкциями. Верхняя часть рисунка показывает локализацию вариантов PD-1 и VHH анти PD-1, закрепленных на клеточной мембране или в аппарате Гольджи / ЭПР, при использовании в конструкции мотива PEBL. Нижняя часть рисунка изображает меченные антителами клетки против PD-1 через 48 ч после трансдукции. Анализ проводился при помощи проточной флуориметрии

Разные варианты клеток Jurkat с Nalm-6 ко-инкубировали в течение 48 ч. Затем была измерена активность люциферазы в клеточном супернатанте. Гиперэкспрессия PD-1 в Jurkat CAR19 и PD-L1 в клетках-мишенях Nalm-6 привела к резкому снижению сигнала по сравнению с контролем (Nalm-6 с низким PD-L1) (Рисунок 6Б). Удаление PD-1 внутриклеточным блокатором aPD-1-PEBL с поверхности Jurkat PD-1 привело к восстановлению секреции люциферазы. Результаты этого эксперимента продемонстрировали, что клетки с CAR19 с ограниченной поверхностной экспрессией PD-1 за счет VHH с мотивом PEBL секретируют люциферазу больше, чем контрольная линия клеток Jurkat PD-1 с CAR19. Удаление

PD-1 с поверхности приводит к усиленной активации CAR-T клеток в присутствии клеток-мишеней.

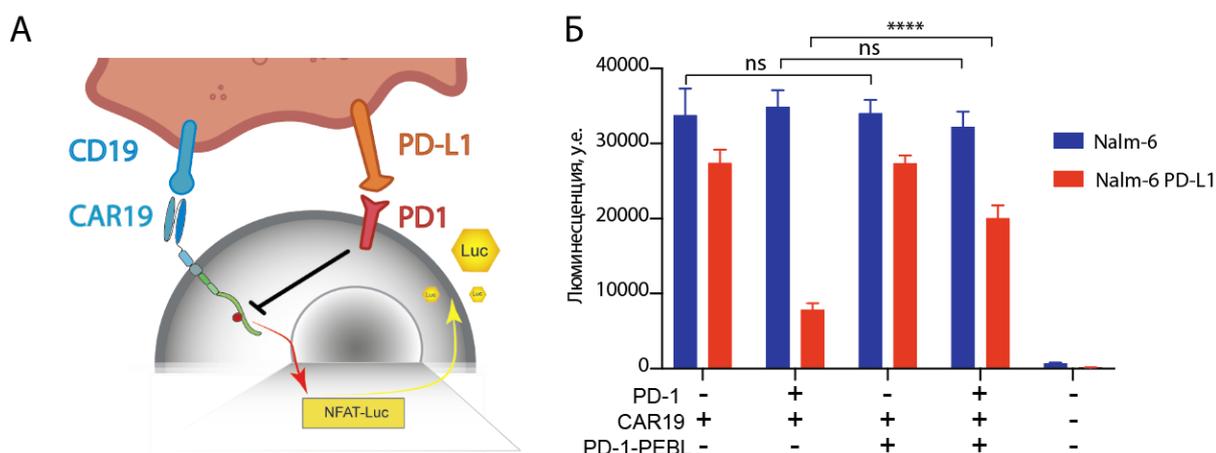


Рисунок 6 – Репортерная клеточная система для оценки PD-1/PD-L1 взаимодействия на основе Jurkat. А) Схематическое изображение репортерной системы Jurkat PD-1 CAR19 с Nalm-6 PD-L1. Б) Анализ активации клеток Jurkat CAR19. PD-1-положительные и контрольные клетки Jurkat были модифицированы CAR19 или CAR19-P2A-aPD-1-PEBL, а затем ко-инкубированы с Nalm-6 и Nalm-6 PD-L1. Через 48 ч супернатант собирали и анализировали на люциферазную активность. Все данные представляли собой среднее значение \pm стандартное отклонение. Значения p определялись с помощью множественного t -критерия. Статистическая значимость: **** $p < 0,0001$

Анти-PD-1 наноантитело-PEBL удаляет PD-1 с поверхности Т-клеток человека, но популяция клеток CAR19-Т с низким PD-1 имеют более высокую долю терминально дифференцированных и истощенных клеток

Т-клетки человека из периферической крови трансдуцировали лентивирусными частицами CAR19-P2A-aPD-1-PEBL или CAR19 (Рисунок 7). Клетки, экспрессирующие CAR19-P2A-aPD-1-PEBL, показывали снижение поверхностного PD-1 по сравнению с контрольными клетками, экспрессирующими только CAR19. Полученные CAR-T клетки далее были использованы в функциональном тесте с последовательным добавлением CD19 положительных клеток-мишеней каждые 3 дня. Параллельное сравнение CAR19-P2A-aPD-1-PEBL и контрольных CAR19-Т клеток в тестах последовательного цитотоксического теста против Nalm-6 PD-L1 и контрольных Nalm-6 показало, что обе группы обладают сходной цитотоксической активностью в первые дни эксперимента. Но когда добавляются свежие клетки-мишени CAR19-Т aPD-1-PEBL Т-клетки быстрее теряют свою цитотоксичность по сравнению с контрольными CAR-T клетками с высоким

уровнем PD-1. Для выяснения причины этого нежелательного эффекта была изучена экспрессия маркеров дифференцировки, а также маркеров, характерных для истощения Т-клеток. Дифференциацию CAR-T клеток оценивали путем иммунофенотипирования антителами анти CD62L и CD45RA. На 9-й день проведения эксперимента, когда снижалась цитотоксичность CAR19-P2A-aPD-1-PEBL против Nalm-6 или Nalm-6 PD-L1, был проведен анализ фенотипа CAR19 или CAR19-P2A-aPD-1-PEBL Т-клеток. Популяция CAR-T клеток с низким уровнем PD-1 содержала больший процент терминально дифференцированных клеток. CAR19-P2A-aPD-1-PEBL Т-клетки имели более высокую долю эффекторных Т-клеток памяти (EM) по сравнению с контрольными CAR19-Т клетками. В дополнение к накоплению EM-клеток, Т-клетки CAR19-P2A-aPD-1-PEBL имели повышенную долю TIGIT (маркер истощения)-положительных клеток.

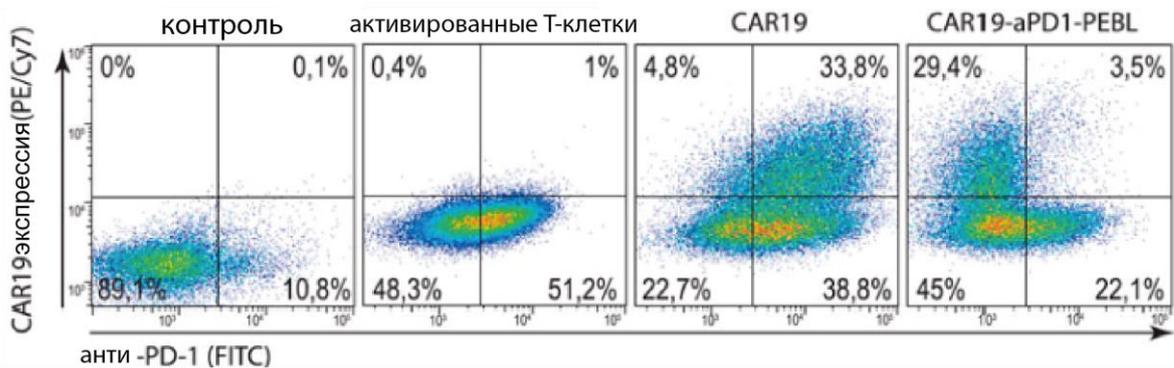


Рисунок 7 – Экспрессия CAR19-P2A-aPD-1-PEBL в Т-клетках эффективно убирает PD-1. Неактивированные и активированные Т-клетки человека, трансдуцированные CAR19 и CAR19-P2A-aPD-1-PEBL, анализировали на предмет экспрессии PD-1 и CAR19 с помощью проточной цитофлуориметрии

В результате проведенных экспериментов пришли к выводу, что удаление PD-1 с поверхности CAR19-Т вызывает повышенную активацию, более быстрое созревание и функциональное истощение клеток, что приводит к пониженной цитотоксичности в продолжительных экспериментах. Аналогичный результат ранее был описан в работах, где CAR-T клетки с терминально дифференцированным и истощенным фенотипом обладали пониженной цитотоксичностью в анализах дегрануляции и ко-инкубации CAR-T клеток с клетками-мишенями. Другое исследование показало, что длительная блокада PD-1 приводит к более быстрому

истощению CAR-T клеток. Возможно, CAR-T клетки более чувствительны к стимулированию апоптоза в отсутствие сигнала PD-1, который обычно ослабляет сильный сигнал через CAR.

В итоге, как это ни парадоксально, снижение передачи сигналов PD-1 привело к ухудшению выживаемости и дисфункции CAR-T клеток, по крайней мере, в нашем исследовании *in vitro*. Результат экспериментов доказывает, что для продления активности CAR-T клеток и успешного уничтожения клеток-мишеней сила сигнала активации, обеспечиваемого CAR, должна уравниваться отрицательным сигналом от иммунных контрольных точек, таких как PD-1. В то время, как простое устранение/нокдаун PD-1 – не лучший вариант для оптимизации CAR-T клеток.

Контроль активности CAR-T клеток с использованием молекулярной пары барназа – барстар

Для усиления эффективности и безопасности лечения онкологических заболеваний разрабатывают модульные CAR, где используется молекула-посредник между опухолевой клеткой и CAR-T клеткой. Мы предлагаем использовать РНКазу-барназу и ее ингибитор – барстар в качестве молекулярной пары для нацеливающего модуля и CAR. Суть подхода заключается в том, что с опухолевым антигеном взаимодействует направляющая молекула – дарпин, слитая с барназой. В свою очередь, с барназой взаимодействует барстар, который входит в состав CAR.

Создание модульной системы BsCAR

Дарпины, слитые с барназой (G3-барназа и 9.29-барназа), были получены в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН и любезно предоставлены д.б.н., академиком РАН, профессором С. М. Деевым. Дарпины G3 и 9.29 взаимодействуют с различными доменами рецептора HER2 (Рисунок 8А). G3 связывается с мембранно-проксимальным доменом IV HER2 ($K_D = 0,09$ нМ), тогда как 9.29 взаимодействует с мембранно-дистальным субдоменом I ($K_D = 3,8$ нМ). Рекомбинантные белки G3-барназа и 9.29-барназа были конъюгированы с флуоресцентной меткой FITC и использованы для окрашивания линии клеток с различным уровнем экспрессии HER2. Подобно терапевтическому моноклональному антителу анти-HER2 (Трастузумаб), рекомбинантные белки G3-барназа и 9.29-

барназа специфически взаимодействуют с HER2-положительной линией клеток BT-474, что было визуализировано методом конфокальной микроскопии (Рисунок 8Б).

Методом проточной цитофлуорометрии было подтверждено специфическое взаимодействие G3-барназы и 9.29-барназы с BT-474. При этом окрашивание не наблюдалось на клетках эпителиального рака молочной железы человека – MDA-MB-231 с нормальной экспрессией HER2 и с HER2-отрицательными клетками CHO (Рисунок 8В). Специфическая цитотоксичность в отношении HER2-положительных клеток BT-474, опосредованная РНКазной активностью G3-барназы и 9.29-барназы, наблюдалась только после длительной инкубации (>10 дней), где $IC_{50} = 9,4 \pm 1,2$ нМ и $4,2 \pm 0,5$ нМ, соответственно (Рисунок 8Г).

Разработка и тестирование BsCAR

На внешней внеклеточной части CAR, связывающей барназу, находится барстар. Для оптимизации внеклеточного домена CAR была использована панель мутантных форм барстара. Аминокислотная последовательность барстара содержит неспаренные цистеины (C40 и C82) и изолейцин 87 (Рисунок 9А), которые могут привести к гомодимеризации рецептора. Димеризация барстара может мешать взаимодействию его с барназой и приводить к неспецифической активации CAR-T клеток. Более того, взаимодействие дарпин-барназы с барстаром в составе CAR требует определенной гибкости, которая может быть достигнута путем встраивания пептидных линкеров. Для решения этих потенциальных проблем была разработана панель конструкций – BsCAR (CAR распознающая часть – барстар). BsCAR были основаны на мутантах барстара и дикого типа, содержащие короткие (G₄S) или длинные 3×(G₄S) линкеры (короткий линкер: BsCARv1, дикий тип; замены C40A и C82A – BsCARv2; и длинные линкеры: BsCARv3 – дикий тип; C40A и C82A – BsCARv4, BsCARv5 – I87E, BsCARv6 – C40A, C82A и I87E) (Рисунок 9А и 9Б).

В состав CAR входят: шарнир IgG₄, мембранный и внутриклеточный домен CD28, внутриклеточный цитоплазматический домен активации от 4-1BB (CD137) и CD3ζ (Рисунок 9Б). Все варианты BsCAR, за исключением BsCARv5, были обнаружены на поверхности Т-клеток при окрашивании линкера IgG₄

специфичными антителами с флуоресцентной меткой DyLight650 (Рисунок 9В слева). Затем BsCAR-T клетки окрашивали 9.29-барназа-FITC, чтобы определить, какой из вариантов BsCAR взаимодействует с барназой. Только четыре из шести вариантов BsCAR (v2, v3, v4 и v6) эффективно взаимодействовали с барназой (Рисунок 9В справа), а BsCARv4 продемонстрировал самое сильное связывание.

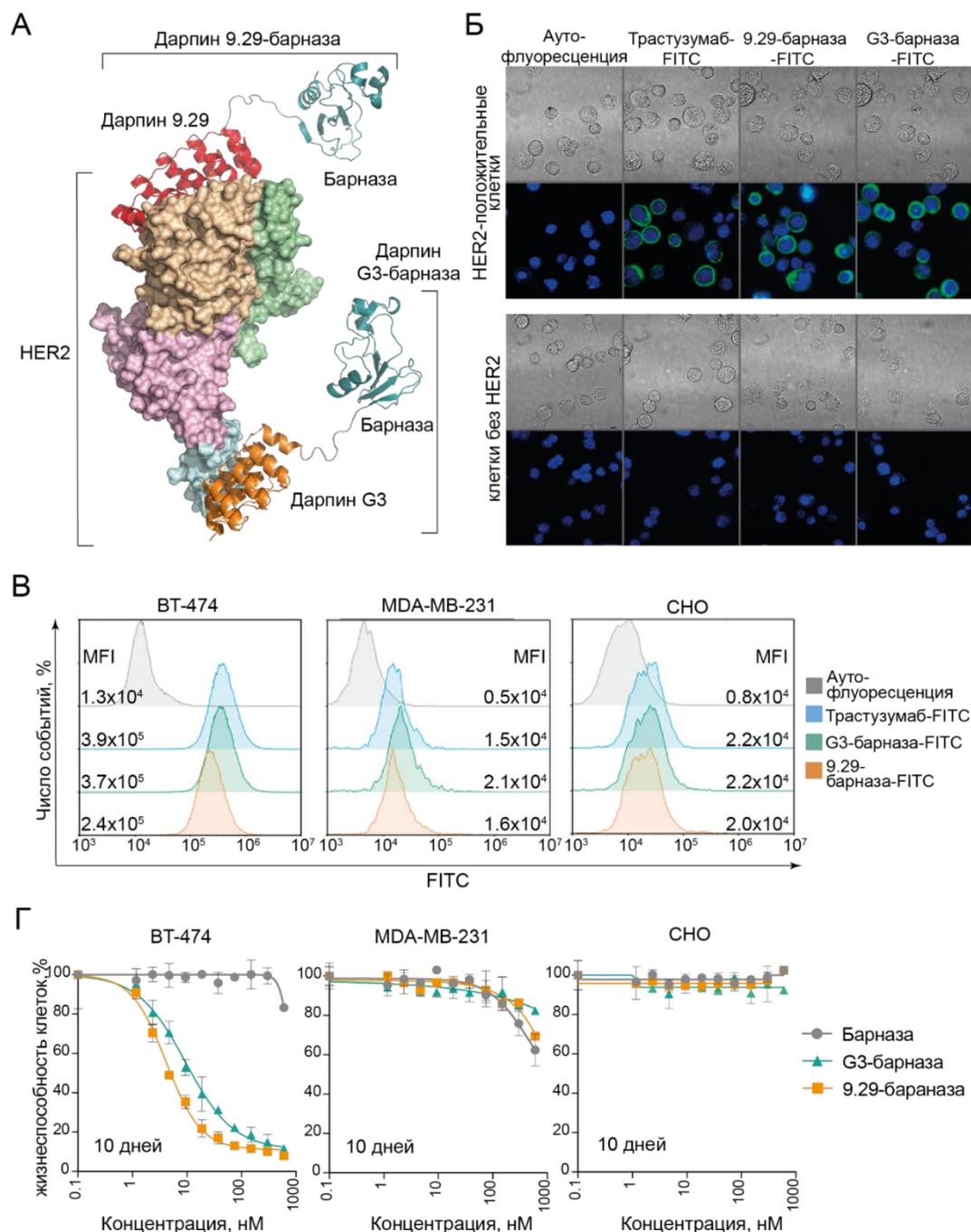


Рисунок 8 – Структура и функциональная активность молекул-посредников – дарпин-барназ. А) Структурная модель, иллюстрирующая взаимодействие между внеклеточным доменом HER2 и молекулами-посредниками – G3-барназой и 9.29-барназой. Б, В) Дарпин-барназы специфически связываются с поверхностью HER2-

положительных клеток. Б) Конфокальная сканирующая микроскопия. Верхняя панель – световое поле. Нижняя панель – наложение FITC и Hoechst33342. В) Проточная цитофлуориметрия. Гистограммы показывают распределение флуоресценции немеченых (аутофлуоресценция – гистограмма серого цвета) и окрашенных клеток. HER2-положительные клетки BT-474, клетки MDA-MB-231 с низким уровнем экспрессии HER2 и контрольные клетки – CHO. Окрашивание выполняли FITC – 9.29-барназой-FITC или G3-барназой-FITC. В качестве положительного контроля использовали антитело к HER2 – трастузумаб, конъюгированное с FITC. Г) Анализ жизнеспособности с использованием резазурина клеток BT-474, MDA-MB-231 и CHO, которые обработали 9.29-барназой, G3-барназой и барназой. Молекулы-посредники вызывают специфическую цитотоксичность HER2-позитивных клеток при продолжительной инкубации – 10 дней. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение

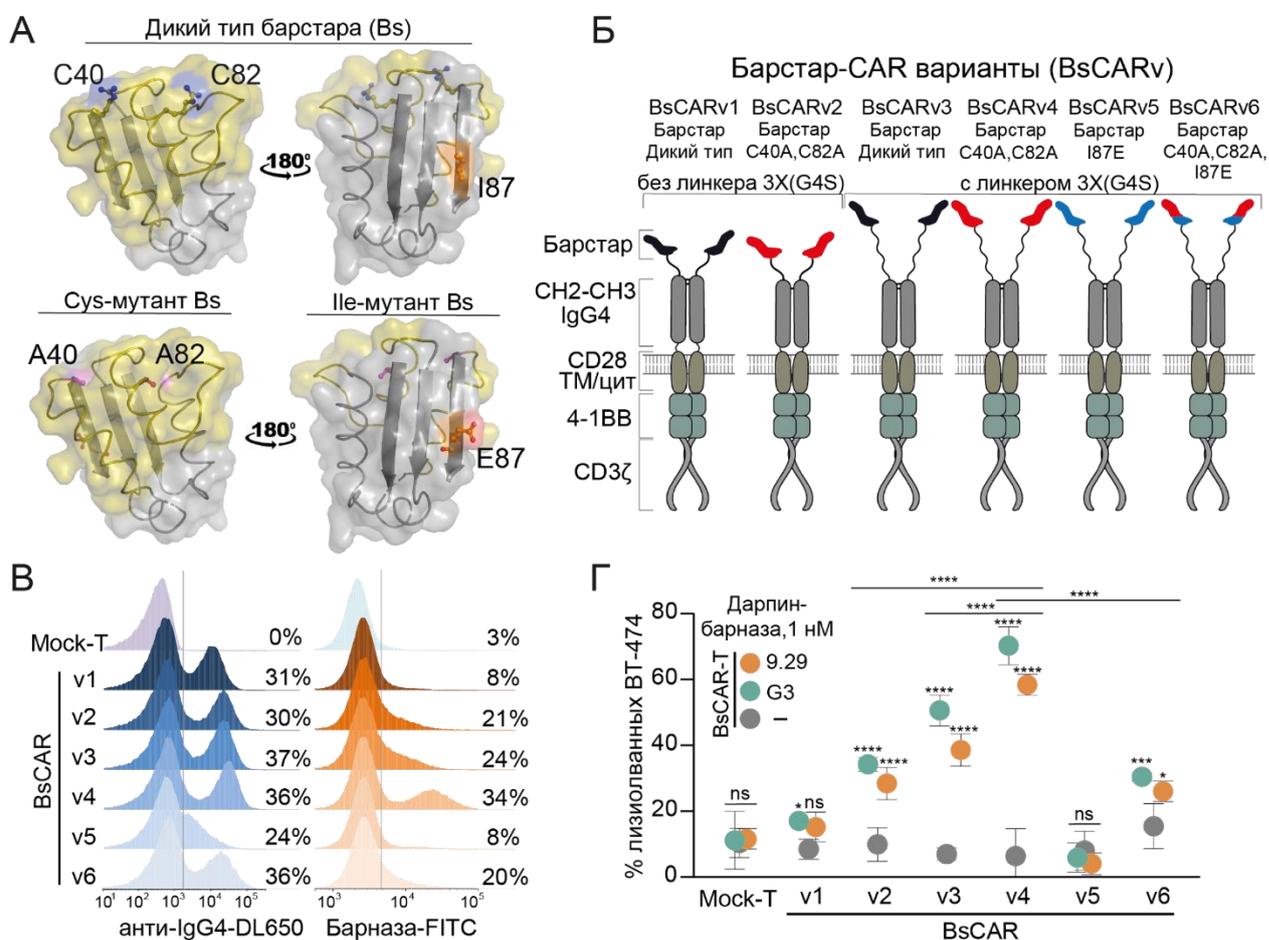


Рисунок 9 – Дизайн и характеристика модульных CAR на основе взаимодействия барназы с барстаром. А) Модель трехмерной структуры барстара (Bs), где указаны мутации вариантов BsCAR. Поверхность, окрашенная желтым цветом, представляет собой интерфейс для взаимодействия с барназой. Аминокислоты в местах мутаций представлены шариками и палочками. Б) Панель вариантов BsCAR. Барстар (Bs), (G3S): линкер Gly-Ser, CD28 TM/цит: трансмембранный и цитоплазматический домены CD28, 4-1BB: домен цитоплазматической активации из CD137, CD3 ζ : домен цитоплазматической активации CD3 дзета. В) Уровень экспрессии BsCAR на поверхности Т-клеток измеряли с помощью антитела анти IgG4 (слева) и окрашивания барназой-FITC (справа). Проценты указывают пропорцию CAR/Bs-позитивных клеток. Г) BsCAR-

опосредованный специфический и неспецифический лизис клеток ВТ-474, индуцированный добавлением 1 нМ 9.29-барназы, G3-барназы или отсутствием молекул-посредников. Соотношение BsCAR-T:ВТ-474 составляло 10:1 (n=4). Данные были проанализированы с помощью двухстороннего дисперсионного анализа с поправкой Даннета для множественных сравнений и представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Значения p между вариантами BsCAR определяли с помощью непарного t-критерия. Статистическая значимость: *p < 0,05, ***p < 0,001, ****p < 0,0001

Далее был проведен анализ цитотоксичности вариантов BsCAR на ВТ-474 в присутствии 1 нМ 9.29-барназы или G3-барназы (Рисунок 9Г). Варианты BsCAR v2, v3, v4 (p < 0,0001) и v6 (p < 0,05) оказывали цитотоксическое действие, опосредованное переключателями 9.29-барназой или G3-барназой. Т-клетки с BsCARv4 индуцировали гибель опухолевых клеток наиболее эффективно (p < 0,0001). Для проведения дальнейших экспериментов *in vitro* и *in vivo* был выбран BsCARv4.

BsCAR-T клетки специфично и дозависимо от молекулы-посредника активируются на опухолевые антигены *in vitro*

Используя набор молекул-посредников BsCAR-T клетки можно нацеливать не только на разные части антигена, но и на другие ТАА. Кроме того, за счет изменения концентрации молекул-посредников, можно осуществлять регуляцию активности BsCAR-T клеток (Рисунок 10А). Путем изменения концентрации 9.29-барназы и G3-барназы определили дозависимую цитотоксичность BsCAR-T клеток. BsCAR-T клетки индуцировали гибель клеток ВТ-474 в присутствии 9.29-барназы или G3-барназы; $IC_{50} = 0,1 \pm 0,06$ и $0,2 \pm 0,1$ нМ, соответственно (Рисунок 10Б). Цитотоксичность более 50% наблюдалась при соотношении BsCAR-T клеток к ВТ-474 1:10 в присутствии 1 нМ дарпин-барназы (Рисунок 10В). Далее было показано, что BsCAR-T клетки секретируют провоспалительные цитокины в присутствии молекул-посредников: $EC_{50} = 0,2 \pm 0,1$ нМ для ИФН- γ и $EC_{50} = 0,6 \pm 0,1$ нМ для ИЛ-2.

Для демонстрации возможности таргетирования различных опухолевых антигенов с помощью BsCAR была разработана молекула-посредник – дарпин ЕС1-барназа, на основе дарпина ЕС1 анти ТАА ЕрСАМ. BsCAR-T клетки эффективно лизировали ЕрСАМ-положительные клетки ВТ-474 в присутствии ЕС1-барназы: $IC_{50} = 0,3 \pm 0,2$ нМ.

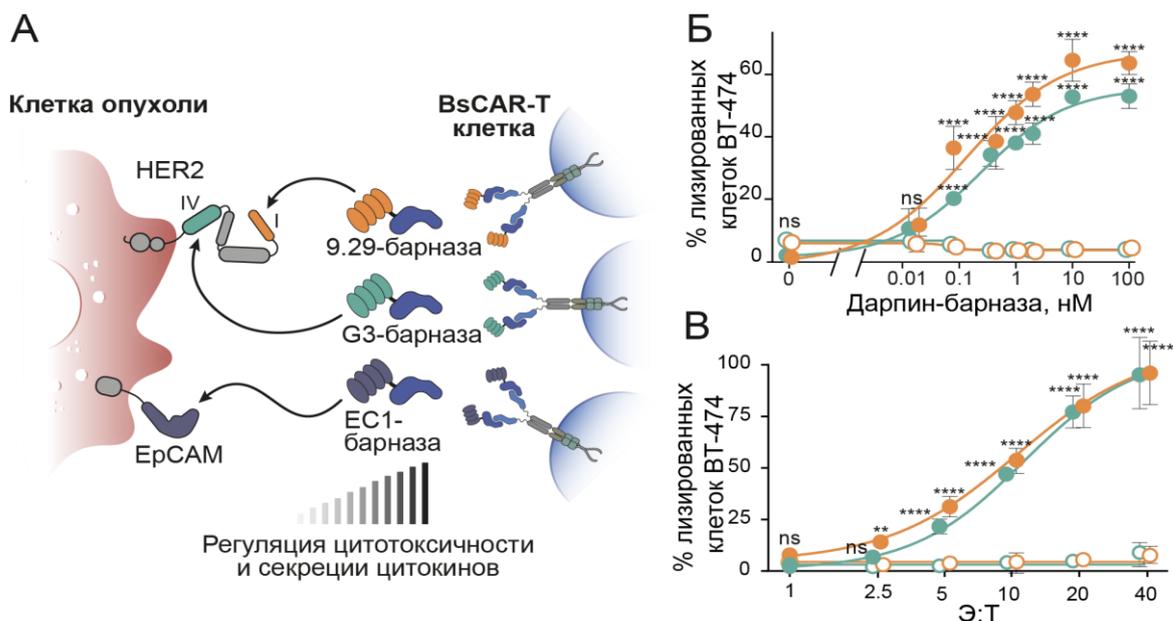


Рисунок 10 – Активация BsCAR-T клетки лизис клеток-мишеней BT-474 *in vitro* зависит от концентрации дарпин-барназы. А) Специфическое связывание через молекулу-посредника опосредует дозозависимое распознавание и нацеливание BsCAR-T клеток на опухолевые клетки. 9.29-барназа и G3-барназа направляют BsCAR-T клетки к дистальным и проксимальным к мембране внеклеточным доменам опухолевого антигена HER2 соответственно. EC1-барназа направляет BsCAR-T клетки против EpCAM-позитивных клеток. Б) Клетки BT-474 совместно инкубировали с BsCAR-T или Mock-T клетками при различных концентрациях 9.29-барназы или G3-барназы (соотношение эффектор:опухолевые клетки – 10:1, n=4). В) Влияние отношения эффектора к клетке-мишени (Э:Т) на лизис клеток BT-474 с помощью BsCAR-T и Mock-T клеток в присутствии 1 нМ 9.29-барназы или G3-барназы. Данные были проанализированы с помощью двустороннего дисперсионного анализа с поправкой Даннета для множественных сравнений и представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Статистическая значимость: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

BsCAR-T клетки элиминируют солидные HER2-положительные опухоли *in vivo*

Эффективность модульной иммунотерапии BsCAR-T клеток была продемонстрирована на наиболее трудно поддающихся лечению солидных опухолях молочной железы на NSG мышах. Для удобного прижизненного мониторинга терапии *in vivo* были получены клетки BT-474, стабильно экспрессирующие люциферазу FLuc. Клетки BT-474 FLuc были подкожно инокулированы в правый бок мышей для образования солидных опухолей. Животные случайным образом были разделены на 3 группы (n = 6). Внутривенно через хвостовую вену им были введены:

- 1) BsCAR-T клетки,

- 2) BsCAR-T клетки и дарпин 9.29-барназа,
- 3) BsCAR-T клетки и DARP G3-барназа.

После однократного введения 10 млн CAR-T клеток проводили курс введения дарпин-барназ тремя сериями по три инъекции в дозах 5, 50 и 500 нМ на кг животного, как показано на схеме лечения (Рисунок 11А). Протокол повышения дозы дарпин-барназы применялся для защиты от цитокинового шторма, улучшения персистенции и для отсрочки истощения CAR T-клеток.

Прижизненная визуализация животных продемонстрировала многообещающий терапевтический потенциал BsCAR-T клеток. Рост опухоли ингибировался комбинацией BsCAR-T клеток и дарпин-барназы, опухоль элиминировалась после второго цикла введения 9.29-барназы (Рисунок 11). Дарпин G3-барназа, которая связывается с проксимальным мембранным доменом HER2, не полностью подавлял рост опухоли (Рисунок 11Б-Г). Для подтверждения синергетического вклада BsCAR-T клеток и дарпин-барназы в подавление опухоли были проведены контрольные монотерапии с циклами повышения дозы 9.29-барназы или инфузия только BsCAR-T клеток, которые не подавляли рост опухоли. Более того, инфильтрация CD8⁺ Т-клеток в опухоль наблюдалась только у животных, которым вводили комбинацию BsCAR-T клеток и 9.29-барназы или G3-барназы.

В отличие от существующих модульных систем, основанных на нековалентных взаимодействиях, барназа и барстар не имеют эндогенных ингибиторов или неспецифических мишеней у млекопитающих. Барназа может быть конъюгирована с любой молекулой, способной распознавать опухолевые антигены, что делает ее универсальным модулем. Дарпин-барназа специфически направляет BsCAR-T клетки человека, вызывая гибель HER2-положительных опухолевых клеток дозозависимым образом. Следовательно, прекращение введения молекул-посредников или введение свободной барназы или барстара может быстро отменить терапию BsCAR-T клетками, что можно использовать для оперативного предотвращения осложнений при терапии.

На основании этих результатов мы считаем, что новые модульные BsCAR-T клетки, управляемые молекулами-посредниками на основе дарпин-барназы, могут

помочь в достижении контролируемой эрадикации солидных опухолей путем одновременного нацеливания на несколько опухолевых антигенов.

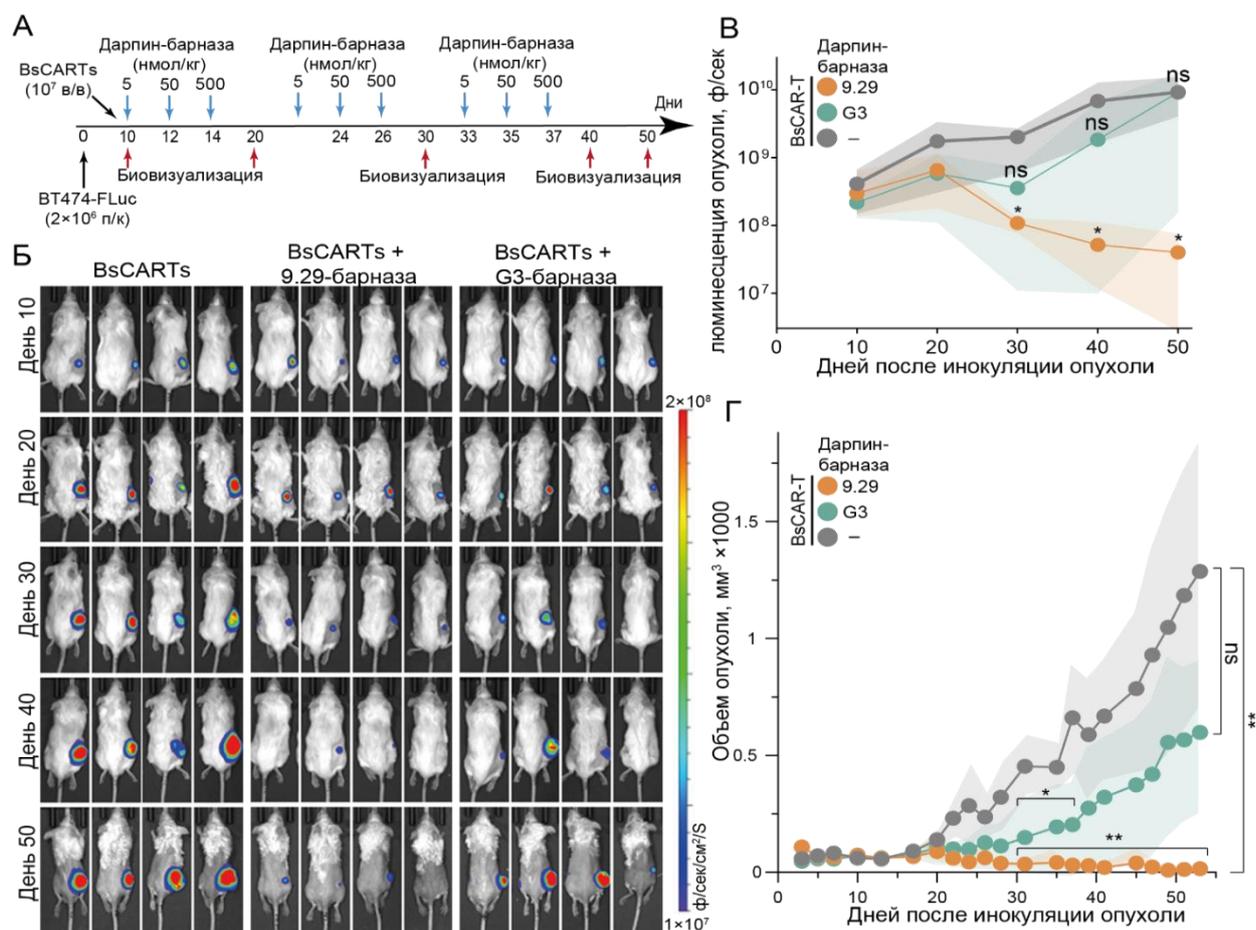


Рисунок 11 – BsCAR-T клетки совместно с введением молекул-посредников подавляют HER2-положительные опухоли *in vivo*. А) Схема лечения, основанная на комбинации BsCAR-T клеток и дарпин-барназы. Мышам NSG имплантировали подкожно 2×10^6 клеток BT-474 FLuc. Через 10 дней после инокуляции опухоли вводили внутривенно 10×10^6 Т-клеток BsCAR. Затем мышей случайным образом распределяли по группам и внутривенно вводили либо PBS, либо возрастающие дозы 9.29-барназы и G3-барназы (5, 50 и 500 нмоль/кг на 10, 12 и 14 день соответственно) ($n=6$ в каждой группе). Курс инъекций дарпин-барназы повторяли 3 раза с недельным перерывом. Б) Репрезентативные изображения IVIS животных, получавших BsCAR-T клетки отдельно или в сочетании с 9.29-барназой и G3-барназой. Представлена биолуминесценция опухолей отдельных мышей в каждой группе. В) Опухолевая нагрузка, оцененная количественно как среднее значение хемилуминесценции в течение 10 – 50 дней. Данные были проанализированы с помощью критерия Манна-Уитни и представлены как среднее \pm диапазон (range). Статистическая значимость: * $p < 0,05$. Г) Динамика роста опухоли в контрольной группе и группах, получавших дарпин-барназу. Данные были проанализированы с помощью критерия Манна-Уитни и представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Статистическая значимость: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

ВЫВОДЫ

1. На основе принципов комбинаторной химии и биологии создана технология получения персонифицированных химерных антигенных рецепторов для борьбы с лимфомами. Показано, что полученные высокоспецифичные CAR-T клетки элиминируют опухолевые клетки как *ex vivo*, так и *in vivo* с одинаковой эффективностью по сравнению с CAR-T клетками, нацеленными на CD19. Преимуществом предложенного подхода является возможность его использования в случаях, когда у пациента CD19 мутирует или отсутствует. Время разработки персонализированной популяции CAR-T клеток для терапии сопоставимо с классической CAR19 терапией.

2. Созданы генно-инженерные конструкции, кодирующие мембранные и внутриклеточный блокатор экспрессии PD-1 на основе наноантитела 102с3 анти PD-1. Продемонстрировано, что созданный CAR с внутриклеточным блокатором PD-1 и с последовательностью PEBL позволяет преодолеть иммуносупрессивное действие опухолевых клеток с повышенной экспрессией PD-L1. Показано, что эффект полного отсутствия PD-1 на поверхности модифицированных CAR-T клеток приводит к быстрой дифференциации до терминального фенотипа и истощению. Тем самым продемонстрировано значение баланса положительных и отрицательных сигналов на адекватную активацию CAR-T клеток.

3. Разработана универсальная модульная система на основе высокоаффинного взаимодействия рибонуклеазы барназы с ее ингибитором барстаром, позволяющая контролировать активность CAR-T клеток в зависимости от концентрации молекулы-посредника дарпин-барназы *in vitro* и *in vivo*. Тем самым можно заключить, что предложенная система имеет высокий потенциал в области технологии «переключения» активности CAR-T клеток для трансляционной медицины.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Stepanov A.V., Markov O.V., Chernikov I.V., Gladkikh D.V., Zhang H., Jones T., Senkova A.V., Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A., **Kalinin R.S.**, Rubtsova M.P., Meleshko A.N., Genkin D.D., Belogurov A.A., Xie J., Gabibov A.G., Lerner R.A. Autocrine-based selection of ligands for personalized CAR-T therapy of lymphoma *Science Advances*. 2018. V. 4. № 11. Eaau4580.
2. **Kalinin R.S.**, Petukhov A.V., Knorre V.D., Maschan M.A., Stepanov A.V., Gabibov A.G. Molecular approaches to safe and controlled engineered T-cell therapy. *Acta Naturae*. 2018. V. 10. № 2 (37). P. 16–23.
3. **Kalinin R.S.**, Ukrainskaya V.M., Chumakov S.P., Moysenovich A.M., Tereshchuk V.M., Volkov D.V., Pershin D.S., Maksimov E.G., Zhang H., Maschan M.A., et al. Engineered Removal of PD-1 From the Surface of CAR19-T Cells Results in Increased Activation and Diminished Survival. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2021. V. 8. № Apr. P. 745286.
4. Stepanov A.V.*, **Kalinin R.S.***, Shipunova V.O.*, Zhang D., Xie J., Rubtsov Y.P., Ukrainskaya V.M., Schulga A.A., Konovalova E.V., Volkov D.V., Yaroshevich I.A., Moysenovich A.M., Belogurov A.A. Jr, Zhang H., Telegin G.B., Chernov A., Maschan M.A., Terekhov S.S., Deyev S.M., Lerner R.A., Gabibov A.G., Altman S. Switchable targeting of solid tumors by BsCAR T. *PNAS*. 2022. V. 119. № 46. E2210562119. (* – равный вклад)

Опубликованные тезисы и доклады:

1. **Kalinin R.S.**, Stepanov A.V, Xie J., Gabibov A.G. (2018). Targeting NHL B-cell Receptors for Personalized CART Therapy, FEBS 43, Prague. FEBS OPEN BIO. P. 2211–5463.
2. **Р.С. Калинин**, А.В. Степанов, С.М. Деев, А.Г. Габибов (2018). Универсальные CAR-T на основе комплекса барназа-барстар для терапии онкологических заболеваний. Белки и пептиды. Москва. 24–25 октября 2018 г., ИБХ РАН. Современные проблемы физико-химической и клеточной биологии: от молекул к живым системам. Межинститутская конференция по результатам проектов, поддержанных Российским научным фондом. С. 45.
3. А.В. Степанов, **Р.С. Калинин**, А.А. Белогуров, А.Г. Габибов (2018). Применение химерных антигенных рецепторов Т-клеток, слитных с лигандами В- и Т-клеточных рецепторов, для терапии лейкемии и лимфомы. 24–25 октября 2018 г., ИБХ РАН. Современные проблемы физико-химической и клеточной биологии: от молекул к живым системам. Межинститутская конференция по результатам проектов, поддержанных Российским научным фондом. С. 41.
4. **Р.С. Калинин** и др. (2021). Контролируемые Т-клетки, модифицированные химерными антигенными рецепторами, на основе комплекса барназа-барстар для adoptивной иммунотерапии рака. Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. Сборник тезисов. XXXIII зимняя международная молодежная научная школа. С 141.

5. **R. Kalinin**, et al. (2021). Modular approach to CAR-T regulation based on the barnase-barstar complex for therapy of oncological diseases. The 45-th FEBS Congress 3–8 July 2021. Lubiana Slovenia. Molecules of Life: Towards new horizons. FEBS Open Bio.
6. V. Knorre, **R. Kalinin**, et al. (2021). Intracellular PD-1 interception for adoptive immunotherapy against PD-L1 positive cancers. FEBS Open Bio 11. P. 298.
7. **Р.С. Калинин** и др. (2022). Белковый интерфейс барназа* барстар является эффективным переключателем активности CAR-T клеток для лечения солидных опухолей *in vivo*. XXXIV Международная зимняя молодежная научная школа – Перспективные направления физико-хим. биологии и биотехнологии. С. 104.
8. **R Kalinin**, et al. (2022). Barnase interactions with barstar tune CART-cells activity against solid tumors. The 25-th IUBMB, 46-th FEBS, 15-th PABMB Congress 9–14 July 2022. Lisbon, Portugal. FEBS Open Bio. V. 12. P. 191.

Работа была выполнена при поддержке РФФ (*грант № 17-74-30019*).