

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

На правах рукописи

Калинин Роман Сергеевич

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

Специальность – 1.5.3. Молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Степанов Алексей Вячеславович

Москва - 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

1	ВВЕДЕНИЕ.....	5
2	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
2.1	Структура химерного антигенного рецептора	10
2.1.1	Лиганд-распознающий домен	10
2.1.2	Шарнирный и трансмембранный домен.....	14
2.2	Передача сигнала через CAR.....	22
2.2.1	Формирование иммунологического синапса CAR.....	23
2.3	Получение CAR-T.....	24
2.4	Проблемы CAR-T-терапии и способы их решения.....	26
2.4.1	CAR-T для лечения солидных опухолей	27
2.4.2	Иммуносупрессивное микроокружение опухоли.....	28
2.4.3	Молекулярные подходы контроля и регуляции CAR-T	31
2.4.4	Контроль активности CAR T-клеток с помощью молекул-посредников	36
3	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	45
3.1	Список используемых реактивов и наборов.....	45
3.2	Растворы и среды для культивирования	47
3.3	Работа с нуклеиновыми кислотами	48
3.4	Работа с белками.....	55
3.5	Эксперименты на эукариотических клетках.....	60
3.6	Эксперименты на мышях.....	73

3.7	Методы и способы обработки результатов и проведения статистического анализа.....	76
4	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	78
4.1	Аутокринный отбор направляющего пептида для персонализированной CAR-T-терапии В-клеточных лимфом.....	78
4.1.1	Идентификация нуклеотидной последовательности В-клеточного рецептора злокачественных В-клеток.....	80
4.1.2	Аутокринный отбор специфического пептида для В-клеточного рецептора.....	81
4.1.3	Специфическая цитотоксичность CAR-T в отношении клеток лимфомы.....	84
4.1.4	ФЛ1-CAR-T эффективны против клеток лимфомы <i>in vivo</i>	89
4.2	Подавление PD-1 на Т-клетке для нарушения супрессорного эффекта опухоли.....	94
4.2.1	Создание репортерной клеточной системы для изучения PD-1/PD-L1 взаимодействия.....	95
4.2.2	Функциональный тест конструкции, снижающей уровень PD-1, на репортерной клеточной системе.....	99
4.2.3	Анти-PD-1 наноантитело-PEBL удаляет PD-1 с поверхности Т-клеток человека.....	100
4.2.4	Популяция клеток CD19 CAR-T с низким PD-1 имеют более высокую долю терминально дифференцированных и истощенных клеток	101
4.3	Контроль активности CAR Т-клеток с использованием молекулярной пары барназа – барстар.....	105
4.3.1	Разработка молекул-посредников модульной системы	106

4.3.2	Разработка и тестирование CAR.....	110
4.3.3	BsCAR Т-клетки специфично и дозависимо от молекулы-посредника активируются на опухолевые антигены <i>in vitro</i>	113
4.3.4	BsCAR-T клетки элиминируют солидные HER2-положительные опухоли <i>in vivo</i>	117
5	ВЫВОДЫ.....	123
6	ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	124
7	БЛАГОДАРНОСТИ	126
8	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	127

1 ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В течение последних десятилетий во всем мире отмечается стабильный рост количества пациентов с онкологическими заболеваниями. В Российской Федерации в настоящее время насчитывается порядка 3,6 – 3,7 млн. человек с онкологическими заболеваниями (2,5% населения). Прирост числа онкологических больных за 2021 г. составил 4,4% по сравнению с 2020 г.[1]. Эти цифры во многом обусловлены не только старением населения, ухудшающейся экологической обстановкой, неблагоприятными экономическими условиями, проблемами ранней диагностики, но и недостаточной эффективностью существующих способов противоопухолевой терапии. Современная терапия – химиотерапия, лучевая терапия, оперативное лечение, не всегда позволяют добиться полной регрессии заболевания. Более того, данные способы лечения обладают серьезными побочными эффектами. По этой причине, становится актуальной задача разработки новых адресных, высокоэффективных и безопасных методов терапии онкологических заболеваний. Развитие технологии получения и применения генно-инженерных Т-клеток, модифицированных химерным антигенным рецептором (CAR), является одним из таких перспективных направлений персонализированной медицины.

Терапия CAR-T клетками изменила многие аспекты клинической и трансляционной онкологии, а значительные успехи, достигнутые на сегодняшний день, привели к быстрому расширению клинических и фундаментальных исследований в этой области. Однако, несмотря на успехи CAR-T терапии, ее применение ассоциировано с существенными побочными эффектами. При лечении злокачественных новообразований, 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 солидных опухолей снижена иммуносупрессорным микроокружением опухоли.

Цель работы и основные задачи исследования

Целью данной работы является создание новых методов и комбинаторных подходов для повышения уровня эффективности и безопасности CAR-T терапии в лечении онкологических заболеваний.

Для этого были поставлены следующие **задачи**:

- создание аутокринной системы отбора пептидного антигена, селективного для В-клеточного рецептора пациента, встраиваемого в структуру распознающего домена CAR. Проверка полученных CAR на модели В-клеточной лимфомы *ex vivo* и *in vivo*;

- создание генно-инженерных конструкций, кодирующих блокаторы экспрессии PD-1 и CAR. Анализ эффекта подавления экспрессии PD-1 на функциональную активность CAR Т-клеток *in vitro*;

- создание и функциональный анализ молекул-посредников, содержащих барназу, и CAR, содержащих барстар. Оценка эффективности модульной CAR системы на основе взаимодействия барназа-барстар *in vivo*.

Представленную работу можно разделить на три логические части. В первой части описана платформа для отбора опухоль-специфичного CAR против В-клеточных лимфом. Вторая часть посвящена исследованию подавления иммуносупрессивного действия PD-L1 на CAR-T клетки с помощью продукции внутриклеточного блокатора PD-1. В третьей части представлена разработка регулируемой модульной системы CAR-T на основе белковой пары барназа-барстар, призванной повысить безопасность применения CAR-T терапии. В обзоре литературы обсуждаются современные сведения о структуре CAR, методы получения CAR Т-клеток, проблема поиска новых лигандов, опасности применения и способы преодоления негативных последствий CAR-T терапии, указываются достоинства и недостатки предложенных методик. В последней

части представлена доказательная база эффективности метода регулирования цитотоксичности CAR-T и перенаправления CAR-T на другой антиген.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы заключается в следующем:

- разработан метод аутокринной селекции направляющего пептида из пептидной библиотеки для CAR против В-клеточной лимфомы. Такие CAR-T элиминируют опухолевые клетки как *ex vivo*, так и *in vivo* также эффективно, как и хорошо известный CAR, нацеленный на CD19. А время разработки персонализированной популяции CAR-T для терапии сопоставимо с классической CAR19 терапией. Отличная от CD19 мишень может понадобиться, когда CD19 отсутствует или подавляется, что может происходить у значительной части пациентов;

- 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 переактивации CAR T-клеток и дальнейшему ухудшению выживаемости. Что указывает на важность соблюдения баланса положительных и отрицательных сигналов на адекватную активацию CAR T-клеток;

- 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*.

Основные положения, выносимые на защиту

1) Платформа аутокринного отбора пептидного лиганда к В-клеточному рецептору из клеток лимфомы позволяет создавать CAR-T клетки, способные специфически элиминировать опухолевый клон.

2) Созданный внутриклеточный блокатор PD-1 эффективно нарушает PD-1/PD-L1 взаимодействие. Но не приводит к лучшей цитотоксичности модифицированных CAR T-клеток.

3) Эффективность универсальной модульной системы CAR на основе молекулярной пары барназа-барстар подтверждена в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием в работе комплекса методических подходов: современных высокочувствительных молекулярно-биологических, биохимических и иммунологических методов исследования, тщательным учетом и подробной оценкой результатов с использованием адекватных методов статистической обработки данных.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на международной конференции FEBS в 2018 г., Прага (Чехия), и в 2021 г., Любляна (Словения); Всероссийской конференции по молекулярной онкологии с международным участием в 2019 г. Москва (Россия), и зимней школе ИБХ РАН 2021 г. и 2022 г., Москва (Россия), в формате устных и стендовых докладов. Статья, посвященная аутокринному отбору лигандов для персонализированной CAR-T терапии лимфомы, опубликована в журнале *Science Advances* в 2018 г. Статья о блокировании мембранной экспрессии PD-1 на поверхности CAR T-клеток, напечатана в журнале *Frontiers in Molecular Biosciences* в 2021 г. Работа по созданию модульных CAR на основе взаимодействия барназа-барстар опубликована в *PNAS* в 2022 г. В 2018 г. по теме работы опубликована обзорная статья в журнале *Acta Naturae*. Во всех перечисленных работах диссертант является первым автором, автором с равным вкладом или автором, внесшим решающий вклад в разделы статьи, вошедшие в данную диссертацию.

2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Передовые достижения в терапии онкологических заболеваний основаны на использовании моноклональных антител и адаптивной иммунотерапии. Наиболее прогрессивным направлением в иммунотерапии рака является применение CAR T-клеток.

Впервые концепция химерных антигенных рецепторов (chimeric antigen receptor, CAR) была описана в конце 80-х годов прошлого века Eshhar Z. и его коллегами в Институте Вейцмана в Израиле [2]. Суть данного подхода заключается в генетической модификации T-клеток пациента или здорового донора геном химерного антигенного рецептора, который распознает опухолевые антигены вне контекста главного комплекса гистосовместимости. CAR, взаимодействуя с мишенью, запускает сигнальные каскады внутри CAR T-клеток, это приводит к их активации и цитотоксичности против клеток мишеней.

На настоящий момент CAR-T клеточная терапия является наиболее передовым способом лечения устойчивых гематологических раковых заболеваний [3–5]. Так, клинические испытания CAR, направленного против В-лимфоцитарного антигена CD19, показали высокую эффективность при лечении резистентных к химиотерапии опухолей В-клеточного происхождения [6–10]. Вместе с тем, при применении CAR терапии нередко возникают значительные побочные эффекты, связанные с неконтролируемой гиперактивацией (цитокиновый шторм) и неспецифической цитотоксичностью [11–17]. Стоит заметить, что при проведении клинических испытаний адаптивной иммунотерапии солидных опухолей, успех CAR терапии в области гематологических опухолевых заболеваний, к сожалению, не повторился. Основной причиной неудач принято считать иммуносупрессивное действие опухолевого микроокружения, гетерогенность солидных опухолей и сложность поиска антигенов-мишеней, которые присутствуют не только в пораженных тканях, но также широко распространены и в здоровых тканях [18–20].

Опухолевые клетки и опухолевое микроокружение обладают повышенной экспрессией PD-L1, агонистом рецептора программируемой смерти PD-1 (Programmable death) на поверхности Т-лимфоцитов [21,22]. Стимуляция PD-1 приводит к нарушению функциональной активности CAR Т-клеток и их гибели [23,24]. На протяжении последнего десятилетия активно изучались различные способы блокирования передачи сигналов PD-1, главным образом, основанные на применении моноклональных антител к PD-1 или PD-L1 [25–27].

2.1 Структура химерного антигенного рецептора

Химерные антигенные рецепторы (CAR) – это рекомбинантные рецепторы, которые перенаправляют Т-клетки на опухоль-ассоциированные антигены – ТАА (tumor-associated antigen – ТАА).

Химерный антигенный рецептор состоит из трех частей (Рисунок 1) [28,29]:

- внеклеточного домена, который распознает антиген,
- шарнирного и трансмембранного домена,
- внутриклеточного домена активации Т-клеток CD3 ζ с иммунорецепторными мотивами активации на основе тирозина (ITAM), а также различных костимулирующих доменов.

2.1.1 Лиганд-распознающий домен

Внеклеточный домен CAR находится в межклеточном пространстве и выполняет функцию распознавания. Он состоит из сигнального пептида, области распознавания антигена и шарнира, связанного с трансмембранным доменом (Рисунок 1).

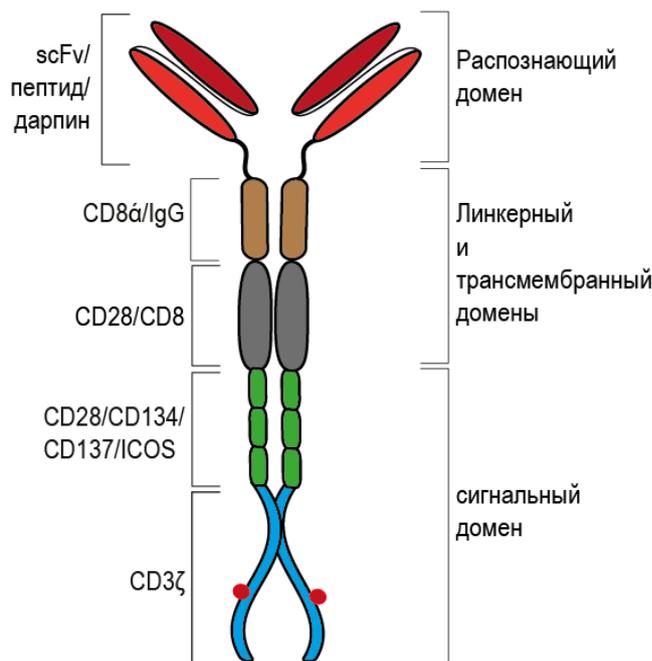


Рисунок 1 – Общая структура CAR. Справа – разделение на структурно-функциональные части CAR. Слева – примеры молекул, которые могут входить в состав CAR

Для распознавания опухолевого антигена в большинстве случаев используют переменные части тяжелой и легкой цепи иммуноглобулинов, слитые в одну цепь через гибкий линкер (scFv). К примеру, широко применяемый в терапии CD19 положительных опухолей – FMC63, является мышиным scFv. Такие CAR с негуманизированными scFv распознаются иммунной системой, как чужеродные антигены, и являются основной причиной непродолжительной персистенции CAR T-клеток [30]. Для улучшения эффективности CAR T-клеток в терапии стали использовать CAR с гуманизированным scFv. После применения инфузии гуманизированных CAR T-клеток, четверо из пяти пациентов с острым лимфобластным лейкозом (B-ALL), у которых возник рецидив после лечения мышиными CAR-T клетками или у которых не было начального ответа на мышиные CAR-T клетки, успешно достигли полного ответа [31]. Недостатком CAR, созданных на основе scFv, является риск лиганд-независимой агрегации, приводящий к неспецифической активации и потере функциональности CAR T-клеток [32–35]. Высокий уровень экспрессии CAR может привести к цис-

взаимодействию переменных доменов (Vh-Vl) в составе соседних молекул CAR. Поэтому в случаях, когда плотности антигенов на клетках-мишенях требуют более высокой экспрессии CAR, следует учитывать возможность агрегации химерных рецепторов на мембране. Также в качестве распознающего домена CAR могут быть использованы: дарпины (повторы анкиринов), наноантитела верблюжьих, пептиды, участки природных рецепторов или их лигандов [36–40].

2.1.1.1 Дисплейные технологии для поиска лиганд-распознающего домена CAR

Для более широкого применения иммунотерапии, и, в том числе CAR-T терапии, необходимо выявлять новые ТАА и находить специфические молекулы к ним. Для этого могут применяться комбинаторные библиотеки, которые создают при помощи рекомбинантных генетических конструкций или методами химического синтеза. Рекомбинантные библиотеки в сочетании с дисплейными технологиями обеспечивают более эффективную и менее затратную альтернативу химическому синтезу. Рекомбинантные генетические конструкции, которые содержат случайную (рандомизированную) последовательность нуклеотидов в определенных участках, кодирующих варьируемые аминокислотные остатки, создают путем проведения ПЦР с использованием одного или нескольких олигонуклеотидных праймеров, включающих такую последовательность, а также фланкирующих олигонуклеотидов. Далее проводят скрининг комбинаторной библиотеки путем ее экспрессии в различных системах связывания полученных белков с целевым лигандом. Затем полученные клоны идентифицируют. Процесс селекции обычно повторяется несколько раз (в несколько раундов) для получения наиболее аффинных молекул. После селекции и идентификации новый отобранный белок производят в достаточных количествах для изучения его свойств. Методы определения последовательности ДНК являются более доступными, поэтому все используемые в настоящее время системы основываются на связи между генотипом (кодирующей последовательностью) и

фенотипом (связывающей активностью) белка. Это позволяет легко идентифицировать и амплифицировать отобранные полипептиды при помощи кодирующих их ДНК или РНК.

Различные системы селекции обладают своими преимуществами и ограничениями. Их выбор в каждом конкретном случае основывается на различных факторах, в частности, доступности и свойствах целевого лиганда. Можно выделить три основных типа систем селекции: клеточного, бесклеточного дисплея и система селекции *in vivo* [41]. При использовании клеточного дисплея в клетки организма-хозяина различными способами вводят ДНК, представляющую собой соответствующую комбинаторную библиотеку. В результате этого связывающие белки экспонируются на поверхности клеток или фаговых частиц (фаговый дисплей), либо экспрессируются в каком-либо клеточном компартменте [42]. Бесклеточные системы основываются на использовании транскрипции и трансляции *in vitro* для конструирования и скрининга комбинаторных библиотек. При помощи данного способа могут быть получены библиотеки размером до 10^{13} вариантов, причем на стадии амплификации возможно проведение мутагенеза *in vitro*, обеспечивающего направленную эволюцию в каждом раунде селекции. В системе селекции *in vivo* целевой лиганд экспрессируется совместно с вариантами связывающих белков из библиотеки, и таким образом, не нужен этап отдельной наработки целевого лиганда [43].

Перспективным методом поиска лигандов к рецепторам является аутокринный отбор, когда в репортерной клетке находится и рецептор, и связанный с мембраной лиганд из комбинаторной библиотеки. На поверхности клетки возникает лиганд-рецепторное взаимодействие, в результате активируется рецептор. В ответ на активацию рецептора происходит продукция репортерного белка, по количеству которого отбираются клетки. В этих клетках анализируются последовательности, кодирующие лиганды, и уже с ними проводится новый раунд селекции. С помощью этого метода из огромного количества кандидатов получают высокоаффинные лиганды (также как в фаговом или дрожжевом

дисплее), но обеспечивается прямой выбор лиганда, который активирует рецептор [44]. С применением репортерных клеточных систем были найдены антитела, которые индуцируют дифференциацию стволовых клеток человека, агонисты G-белка GLP-1R с антидиабетической активностью [44,45].

Этот подход можно применить и для поиска распознающей части CAR. Если лиганд из комбинаторной библиотеки будет в составе CAR, а ТАА будет заякорен в мембране, то можно отбирать репортерные клетки, в которых произошла активация CAR в ответ на взаимодействие. В частности, в данной диссертационной работе использовалась рекомбинантная рандомизированная библиотека циклопептидов в составе распознающего домена CAR, а в качестве ТАА выступал B-клеточный рецептор, полученный из клеток лимфомы. При взаимодействии B-клеточного рецептора и лиганда в составе CAR происходила активация CAR, активированные CAR-T клетки отбирались для анализа отобранного циклопептида.

2.1.2 Шарнирный и трансмембранный домен

2.1.2.1 Шарнирный домен

Расположение эпитопа влияет на размер щели иммунного синапса. Расстояние между опухолевой клеткой и CAR-T определяет эффективность доставки цитотоксических гранул и сегрегацию фосфатаз [46–48]. Было обнаружено, что CAR, нацеленный на мембранно-дистальный эпитоп CD22, во-первых, имеет более слабую передачу сигналов, во-вторых, более низкую литическую эффективность, в-третьих, дефектную дегрануляцию по сравнению со связыванием CAR с проксимальным к мембране эпитопом [49]. Промежуток иммунного синапса можно настраивать с помощью шарнирного домена. Шарнир (линкер или спейсер), соединяет лиганд-распознающий домен с трансмембранным доменом CAR. Поскольку варьирование размера шарнира

используется для регуляции расстояния иммунологической синаптической щели, то он влияет на передачу сигналов и эффективность лизиса опухолевых клеток. Оптимальная дистанция между ТАА на опухолевой и CAR-T клетками настраивается путем подбора шарниров различной длины. Для таргетирования эпитопов ТАА, расположенных близко к мембране, используют CAR с длинным шарниром, в остальных случаях используются короткие последовательности [50–52]. Например, использование очень гибкого шарнира IgD вместо распространенного шарнира CD28 обусловило лучшее распознавание стерически затрудненного эпитопа MUC1 [53].

Наиболее часто используемые в дизайне CAR шарниры получают из молекул: IgG1 (Fc), IgG4 и CD8 и CD28. Однако, при использовании Fc могут возникнуть проблемы, когда неспецифические взаимодействия с FcγR могут запустить не только AICD, но и врожденный иммунитет. Это ограничивает персистенцию CAR T-клеток *in vivo* [54–57]. Точечные мутации CH2 домена позволяют существенно снизить взаимодействие CAR с FcγR [57].

Помимо того, что шарниры играют ключевую роль в передаче сигналов CAR, они также обычно используются для количественной оценки и сортировки CAR-положительных T-клеток. Например, антитела анти Fc используются для количественной оценки экспрессии CAR (с шарниром IgG-Fc) на клеточной поверхности, в том числе, и в представленной диссертационной работе.

2.1.2.2 Трансмембранный домен и внутриклеточный домен CAR

В состав химерного антигенного рецептора, кроме того, входит трансмембранный домен и внутриклеточный домен CAR. Трансмембранный домен закрепляет рецептор на поверхности клетки и передает сигналы распознавания лиганда во внутриклеточный цитоплазматический домен. Преобразование длины соединительных областей эктодомена и эндодомена трансмембранного домена изменяют структуру CAR, что, в свою очередь, приводит к изменениям в передаче сигнала, в том числе замедляет пролиферацию

клеток CAR-T без ослабления их активности. Это дает возможность контролировать воспалительные цитокины в течение длительного периода времени [58]. В настоящее время в дизайне CAR применяют трансмембранные домены CD8, CD28 и CD3.

Внутриклеточный домен CAR содержит сигнальный домен CD3 ζ , который, инициирует активацию Т-клетки. Благодаря фосфорилированию в CD3 ζ иммунорецепторных мотивов активации на основе тирозина (ITAM) происходит протеинкиназный сигнальный каскад, активирующий Т-клетку [59]. В состав CAR также входят костимулирующие рецепторы. Они необходимы для создания устойчивой передачи сигналов, предотвращения анергии, пролиферации и дифференцировки [60] (Таблица 1).

Таблица 1 – Костимуляторные молекулы, используемые в конструкции CAR
(адаптировано из [60])

Костимуляторная молекула	Лиганды	Экспрессия на Т-клетках	Функция для CAR-T
IgG суперсемейство			
CD28	CD80/CD86	Активированные Т-клетки	Сильная цитотоксичность; активация экспрессии ИЛ-2; может способствовать размножению CD4 ⁺ Т-лимфоцитов
ICOS (CD278)	ICOS-L (CD275)	Активированные Т-клетки, особенно Th1 и Th17	Может способствовать поляризации в Th1 и Th17
Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей			
4-1BB (CD137)	4-1BBL (CD137L)	Клетки памяти и CD8 ⁺ Т-клетки; CD4 ⁺ Т-клетки только при активации	Стимулирует генерацию CD8 ⁺ Т-клеток центральной памяти. Способствует сохранению CAR Т-клеток
OX40 (CD134)	OX40L (CD252)	Активированные Т-клетки	Уменьшается количество Т-регуляторных клеток (Treg) при дифференциации
CD27	CD70	Активированные Т-клетки	Повышается экспрессия белка Bcl-X (L), что способствует персистенции

			CAR T-клеток
CD40	CD40L (CD154)	Активированные Т-клетки	Увеличивает пролиферацию и секрецию провоспалительных цитокинов
Другие			
CD40L	CD40	Активированные Т-клетки	Усиление костимулирующей активности и высвобождения цитокинов
Толл-подобные рецепторы	Консервативные части микроорганизмов	Активированные Т-клетки	Усиливает эффекторную функцию и цитотоксичность; увеличивает выработку IL-2, IFN- γ и ГМ-КСФ (Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор)

2.1.2.3 Первое поколение CAR

В зависимости от структуры внутриклеточного домена выделяют четыре поколения CAR [61,62] (Рисунок 2). В состав молекулы первого поколения CAR входит внеклеточный распознающий домен с внутриклеточной частью, представленной цитоплазматическим доменом CD3 ζ или γ цепью Fc рецептора (FcRRI γ) [2,63,64].

CAR-T с CD3 ζ -цепью более эффективные, чем с FcRRI γ -цепью, так как в CD3 ζ -цепь входит три повтора ITAM, тогда как в FcRRI γ – только один. Большинство исследований с CAR первого поколения (специфичные к раково-эмбриональному антигену, α -рецептору фолата; CE7R CAR; scFv(G250) CAR; GD2 CAR и CD10 CAR) не достигли желаемых результатов из-за недостаточной пролиферации, короткой продолжительности жизни *in vivo* и низкой секреции цитокинов [65–70].

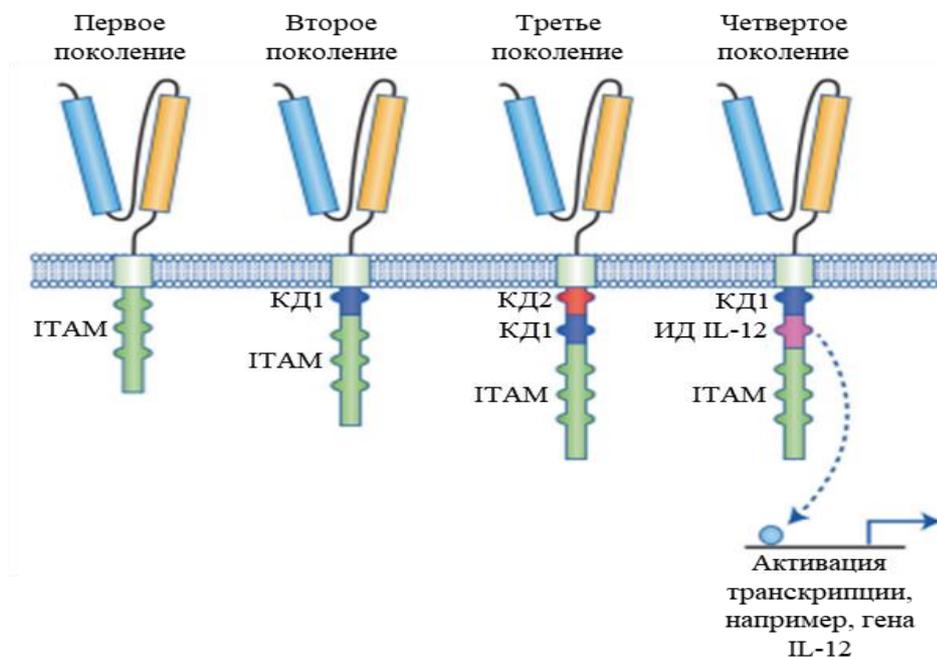


Рисунок 2 – Четыре поколения CAR (адаптировано из [62]).
 КД – костимулирующий домен, ИД – индуцибельный домен

2.1.2.4 Второе поколение CAR

Для CAR второго поколения, помимо присутствия CD3 ζ , характерно наличие одного из сигнальных доменов костимуляторных молекул Т клетки: CD28 (B7 и ICOS), CD134 (OX40) или CD137 (4-1BB) [71]. Ко-стимуляторные домены CAR увеличивают пролиферацию и выживаемость модифицированных клеток [72]. CD28 очень важна в регуляции пролиферации и выживания лимфоцитов в качестве опосредованной костимуляции. Она также играет ключевую роль в создании клеток памяти и эффекторных клеток. OX40 – поддерживает пролиферацию и усиливает секрецию ИЛ-2. 4-1BB – участвует в передаче сигнала между Т-клетками и играет ключевую роль в выживании [73]. Доклинические испытания показали, что костимуляционный домен 4-1BB способствует формированию подтипа памяти T_{cm}, тогда как костимуляционный домен CD28 способствует образованию подтипа T_{em} [74]. Поэтому CAR-Т клетки с костимуляционным доменом 4-1BB живут дольше, чем CAR-Т клетки с

костимуляционным доменом CD28, и их обнаруживают спустя годы после лечения [75,76]. Кроме того, по сравнению с CD28, 4-1BB вызывает более слабую тоническую передачу сигналов в CAR T-клетках за счет более медленного и менее интенсивного фосфорилирования [77]. В результате, истощение происходит медленнее для CAR T-клеток с 4-1BB, чем для CAR T-клеток с CD28 [33,78]. Вполне вероятно, что эти сильно различающиеся фенотипы возникают в результате активации различных сигнальных путей. В нормальных T-клетках 4-1BB обычно инициирует нисходящую передачу сигналов посредством рекрутирования TNFR-ассоциированных факторов [79], а CD28, напротив, передает сигналы через фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K)-АКТ [80]. Предполагается, что эти пути сохраняются в CAR-T-клетках, но возможно, когда домены молекул помещаются в контекст конструкции CAR, они активируют и другие пути. Кроме этого, Xiong и соавторы сделали интересное наблюдение – CAR на основе 4–1BB формирует более качественный иммунологический синапс, нежели CAR на основе CD28. Они предложили в роли предиктора эффективности *in vivo* использовать качество иммунологических синапсов [81].

Очередность CAR костимулирующих доменов влияет на их эффекторные функции T клетки. Исследование функциональных различий между CAR CD28-CD3 ζ и CAR CD3 ζ -CD28 показало, что CD28-CD3 ζ T-клетки секретируют более высокие уровни IL-2 и, что особенно важно, способны проходить повторяющиеся циклы стимуляции и размножения, а это имеет решающее значение для устойчивой терапии [82]. Авторы статьи полагают, что эффективность CD28-CD3 ζ может быть обусловлена лучшей структурной целостностью, которая усиливает передачу сигнала, или близостью CD28 к мембране и сигнальным протеинкиназам.

Клинические испытания CAR второго поколения оказались заметно результативнее, чем клинические испытания с CAR первого поколения [83,84]. Однако, проблемы пролиферации и персистенции CAR T-клеток не могут быть решены с помощью единственного костимуляторного домена.

2.1.2.5 Третье поколение CAR

В целях усиления продукции цитокинов и цитотоксичности раковых клеток были разработаны CAR третьего поколения. Они создаются путем объединения нескольких сигнальных доменов, таких как: OX40-CD28-CD3 ζ или 4-1BB-CD28-CD3 ζ [85]. Т-клетки, модифицированные данными рецепторами, секретируют более широкий спектр цитокинов (например, TNF α , GM-CSF и IFN γ) и в меньшей степени подвержены клеточной смерти после активации, что повысило эффективность CAR Т-клеток в опытах на мышах [86,87]. Доклинические исследования CAR против PSMA и мезотелина CD28–4–1BB–CD3 ζ третьего поколения обнаружили превосходную эрадикацию опухоли и лучшую персистенцию по сравнению с CAR второго поколения [88,89]. Аналогично, антимезотелиновые CAR на основе ICOS–4–1BB–CD3 ζ третьего поколения обладали повышенной противоопухолевой активностью [90]. Однако, превосходство CAR третьего поколения над аналогами второго поколения все еще остается предметом споров. Так, при использовании CAR третьего поколения для лечения лимфомы с применением анти-CD19 CAR и костимуляторными доменами CD28 и 4-1BB, а также для лечения рака толстой кишки анти-HER2 CAR не были эффективнее CAR второго поколения [91,92]. К этому можно добавить исследование, где *in vitro* эксперименты показали преимущество CAR-третьего поколения GD2 на основе CD28-OX40-CD3 ζ над вторым (CD28-CD3 ζ или OX40-CD3 ζ) и первым (CD3 ζ) [93]. Однако, на клинической стадии исследований результаты терапии с использованием CAR третьего поколения не были значительно лучше, чем с CAR второго поколения [68,94,95].

2.1.2.6 Четвертое поколение CAR

CAR четвертого поколения имеет индуцибельные домены ИЛ-12 или ИЛ-15 расположенные между костимулирующим доменом и CD3 ζ . При нормальном иммунном состоянии организма цитокины являются главными регуляторами

воспалительных процессов. Однако, микроокружение опухоли может подавлять функции иммунных клеток. [96]. Поэтому Т-клеточная терапия не всегда эффективна в борьбе с солидными опухолями с развитым микроокружением. Для усиления иммунной терапии, включая терапию CAR-T клетками, в ряде работ сочетано использовали провоспалительные цитокины ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-15 [97,98]. Согласно клиническим испытаниям, для подавления иммуносупрессии микроокружения опухоли эта стратегия оказалась удачной, например:

CAR-T с ИЛ-12 – против рецептора VEGF-2, нацеливание на который может нарушить процесс ангиогенеза и предотвратить инвазию опухолевых клеток [99];

CAR-T с ИЛ-12 – против MUC-16, который гиперэкспрессируется при раке яичника [100,101];

CAR-T с ИЛ-12 – против MUC-1, при раке семенников [102];

CAR-T с ИЛ-15 – против GD2, для ксеногенной метастатической модели нейробластомы [103], а также для лечения вирусных инфекций, нарушения обмена веществ и аутоиммунных заболеваний [104].

Еще одной нерешенной проблемой в разработке CAR-T является определение количественных параметров *in vitro*, которые могут быть коррелированы с эффективностью *in vivo*. Было показано, что высокие уровни активации и секреции цитокинов *in vitro*, не всегда коррелируют результатами *in vivo* исследований [20,56,105,106]. Таким образом, функциональные анализы *in vitro* для дизайна CAR-T необходимо дополнительно подтверждать *in vivo*, не только на животных моделях, но и на основании клинических данных.

В Т-клетках интенсивность сигнала ТКР зависит от сродства и плотности с главным комплексом гистосовместимости (ГКГ) [107,108]. В CAR Т-клетках эффективность передачи сигнала зависит от всех его структурных компонентов.

2.2 Передача сигнала через CAR

В связи с тем, что CAR T-клетки производят из T-лимфоцитов, а также CAR включают в себя хорошо охарактеризованные компоненты передачи сигналов T-клеток, было выдвинуто предположение, что сигналинг CAR аналогичен ТКР. Однако, недавно проведенные исследования продемонстрировали, что многие аспекты передачи сигналов CAR уникальны, отличаются от эндогенной передачи сигналов ТКР и даже различны между конструкциями CAR [63,77,109–112].

ТКР распознают пептид в составе главного комплекса гистосовместимости (ГКГ, на англ. major histocompatibility complex – МНС). Данные пептиды образуются в результате деградации цитоплазматических белков в протеасоме для ГКГ-I или расщепления в лизосомах внеклеточных белков для ГКГ-II. Тогда как CAR распознает нативный белок напрямую.

ТКР опосредованная, активация T-клетки требует три разных сигнала. После распознавания пептида ТКР в составе ГКГ происходит активация T-клеток – это сигнал 1. Комплекс ТКР-пептид-ГКГ стабилизируется взаимодействием корцептора с ГКГ (CD8 для ГКГ-I и CD4 для ГКГ-II), что усиливает рекрутирование и активацию тирозинкиназы Lck (англ. Lymphocyte kinase) семейства Src-киназ. Второй сигнал идет от костимулирующих молекул – CD28, 4-1BB и OX40. В T-клетках сигнал 2 не полностью синхронизирован с сигналом 1, а также может не возникать точно в том же месте. Напротив, в CAR-T-клетках сигнал 1 и сигнал 2 обусловлены распознаванием антигена. Третий сигнал опосредован цитокинами и обычно возникает позднее сигналов 1 и 2.

После активации T-клетки и CAR-T клетки экспрессируют молекулы активации CD69, CD137, перфорин и гранзим В, а также супрессорные регуляторные молекулы, такие как PD-1, CTLA-4, LAG-1, TIMP3 (тканевый ингибитор матриксной металлопротеиназы 3) и TIGIT (англ. T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains).

2.2.1 Формирование иммунологического синапса CAR

Сигнальные пути 1 и 2 в Т-клетках приводят к образованию иммунологического синапса (контакт между клеткой-мишенью или антигенпрезентирующей клеткой и лимфоцитом) большого и хорошо организованного супрамолекулярного активационного кластера (англ. supramolecular activation cluster, SMAC). SMAC необходим для пространственной сегрегации протеинкиназ и фосфатаз и облегчения доставки литических гранул к мишени [113]. Впрочем, было обнаружено что цитотоксические Т-клетки могут уничтожать мишени и до образования зрелого иммунологического синапса [114].

CAR Т-клетки, напротив, формируют только примитивные и дезорганизованные иммунологические синапсы [47,81,115]. Причины этого полностью не выяснены, этому могут способствовать многие механизмы. Например, между CAR-Т и клеткой мишенью не настолько близкое физическое сближение, как у обычных Т-клеток [115,116]. Конфокальная визуализация CAR-опосредованного иммунологического синапса в модельной системе неиммунных клеток продемонстрировала значительную извитость клеточной мембраны [116]. Кроме того, конкатенация 1 и 2 сигнальных путей цитоплазматических доменов CAR, по-видимому, приводит к более быстрой передаче сигналов, чем в обычных ТКР, что может не обеспечивать достаточного времени для полного формирования иммунологического синапса [115]. Было показано, что неорганизованное формирование иммунологического синапса может, как это ни парадоксально, увеличивать скорость дегрануляции CAR Т-клеток, а также скорость, с которой они отделяются от клеток-мишеней [115]. Важно отметить, что это исследование проводилось на CD28-содержащих CAR Т-клетках второго поколения, которые способны независимо рекрутировать факторы, необходимые для перестройки цитоскелета для дегрануляции. Возможно, что это ускорение не будет наблюдаться в CAR Т-клетках второго поколения, содержащих 4-1BB.

Таким образом, разнообразие доменов, которые можно применить в конструкции CAR имеет значительное влияние на формирование иммунологического синапса, цитолитическую активность и передачу сигналов CAR Т-клеток. Все это требует дальнейшего изучения, так как результаты противоречивы и в значительной мере зависят от контекста CAR, что усложняет обобщение.

2.3 Получение CAR-T

Важной стадией в подготовке CAR-T является получение большой популяции модифицированных Т-клеток, которые производятся в несколько этапов. На каждом из этапов крайне необходимо постоянно осуществлять контроль качества [117].

На первом – происходит забор лейкоцитов с использованием лейкофореза у пациентов или доноров. Большинство доступных в настоящее время CAR Т-клеток получают из Т-клеток, собранных у самих пациентов. При этом, у некоторых невозможно получить пригодные для терапии Т-клетки, например, у пациентов со злокачественными Т-клетками. Поэтому есть необходимость в использовании аллогенных Т-клеток. Однако, существует опасность в том, что их использование может приводить к тяжелой РТПХ [118]. Но результаты клинических исследований показали, что из 72 человек, получавших аллогенные анти-CD19 CAR Т-клетки после рецидива В-клеточных злокачественных новообразований, только 5 пациентов испытали РТПХ [119,120].

На втором этапе Т-клетки обогащаются и отделяются от остальных лейкоцитов. Полученные на первом этапе клетки активируют с помощью CD3 и CD28 антител в сочетании с факторами роста и цитокинами, к примеру, ИЛ-2. Есть данные, что CAR-T, культивируемые в присутствии ИЛ-7 и ИЛ-15, имели более высокую выживаемость *in vivo* по сравнению с CAR-T, культивируемыми с ИЛ-2 [121]. Например, культивирование GD2 специфичных CAR-T в присутствии

ИЛ-7 и ИЛ-15 дало лучшую эффекторную активность, не повлияв на выживаемость клеток памяти [122]. Интересно, что на поляризацию клеток в определенный фенотип можно влиять изменением условий культивирования [123,124]. К примеру, предварительная обработка Т-клеток ИЛ-7 и ИЛ-15 или ИЛ-15 и ИЛ-21 усиливают функции Т-клеток памяти [68]. Кроме этого, отдельно ИЛ-15 усиливает функцию клеток памяти CD8⁺ [72].

На третьем этапе в геном полученных Т-клеток встраивают последовательность CAR. Основным способом модификации клеток в фундаментальных и клинических исследованиях является вирусный вектор, который обладает высокой эффективностью переноса генов за сравнительно короткое время. Вирусы с геном интереса могут изготавливаться в большом объеме и храниться при температуре -80°C [126]. На практике чаще всего применяются ретровирусы и лентивирусы, но также используют аденовирусы и аденоассоциированные вирусы. Однако, вирусные векторы потенциально онкогенные и токсичные [127]. Лентивирусные векторы третьего поколения используются в клинических испытаниях чаще, чем гамма-ретровирусные векторы, так как их профиль сайта интеграции наиболее безопасный [128]. Наряду с этим, в генной терапии для переноса ДНК в клетку используют химические носители. Они обладают высокой эффективностью трансфекции, специфичностью и способностью переносить неограниченное количество ДНК [129]. Кроме того, для переноса генов в качестве вектора используют малые закольцованные ДНК [130]. Кроме этого, также применяется технология CRISPR/Cas9 [131]. Выбор векторной системы для доставки и сайта встраивания CAR существенно влияет на эффективность CAR Т-клеток [33,61,131]. Модификация CAR может производиться также с клетками врожденного иммунитета – натуральными киллерами. Однако, по этой теме существуют пока только доклинические и ранние клинические исследования [132–134]. Далее, полученные CAR-Т клетки наращивают в биореакторах и вводят пациенту. Важно отметить, что перед началом терапии CAR-Т у пациента снижают количество

циркулирующих Т-клеток, а также Трег Т-клеток с помощью флударабина и / или циклофосфида [135]. Это помогает увеличить пролиферацию трансформированных Т-клеток за счет снижения конкуренции ИЛ-7 и ИЛ-15 и усиливает иммунотерапию CAR-T клетками [136].

2.4 Проблемы CAR-T-терапии и способы их решения

Отличительной особенностью CAR-T-терапии, выявленной уже при первых клинических испытаниях, оказалась их исключительная результативность. В настоящее время для лечения используются CAR-T препараты: нацеленные против CD19 – Аксикабтаген силотейсел [15,137,138], Тисагенлеклейсел [14,138], Брексукаптаген аутолейсел [139] и Лизокабтаген маралеусел [140,141], а также нацеленный на трансмембранный гликопротеин суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей 17 – TNFRSF17 (BCMA) В-клеток - Идекабтаген Виклейсел [142]. Введение модифицированных Т-клеток приводит к экспоненциальному росту их численности и активной элиминации опухолевых клеток в течение нескольких недель [143]. Однако, обратной стороной такой эффективной терапии является высокий риск возникновения системных и опасных для жизни побочных эффектов, в первую очередь, гиперцитокинемии (цитокиновый шторм, цитокиновый каскад, синдром выброса цитокинов (CRS)), нейротоксичности (синдром CAR-связанной энцефалопатии, CRES) и синдрома лизиса опухоли [144,145,121,13]. Эти осложнения могут спровоцировать развитие синдрома полиорганной недостаточности и, как следствие, привести к летальному исходу. CRS разной степени отмечался у 90% пациентов, получавших CAR-T клетки, из них тяжелый CRS наблюдался у 13%. CRES отмечался у 64% пациентов, из них тяжелый CRES имел место у 28% [15]. Купировать осложнения, вызванные Т-клетками, можно кортикостероидами цитостатического и цитотоксического действия [146], но это приводит к подавлению всех Т-клеток и вызывает ряд побочных эффектов, например, полиорганную недостаточность

[147]. В этой связи крайне актуальной является задача своевременной отмены эффекта CAR-T, т. е. создания эффективных «антидотов», эффекторов, регуляторов их активности. Необходимо разработать для CAR-T терапии систему регуляции фармакокинетики и фармакодинамики. О решении поставленных проблем будет сказано ниже.

2.4.1 CAR-T для лечения солидных опухолей

Еще одна существенная проблема применения CAR-T – это неспецифическая цитотоксичность, особенно актуальная в случае терапии солидных опухолей, к которым крайне сложно подобрать специфичные ТАА [19,66,71,148]. Кроме того, опухоли неоднородны. Так, обычные CAR T-клетки обладают фиксированной специфичностью к антигену. Это делает терапию уязвимой к рецидиву в случае потери антигена опухолевыми клетками [149,150]. CAR-T-терапия, нацеленная на единственный антиген, может первоначально продемонстрировать регресс опухоли. Тем не менее, в клинических испытаниях сообщалось случаях антиген-отрицательного рецидива после терапии CD19 CAR-T [151,152]. Поэтому важно иметь альтернативной специфичности CAR для терапии пациентов, у которых опухоль потеряла ТАА на который направлена терапия.

В качестве антигенов солидных опухолей для терапии CAR-T выделяют: EGFR [153–155], HER2 [156–158], NKG2D-лиганды [159,160], B7-H3 [161–163], Муцин 1 (MUC1) [164], карциноэмбриональный антиген (CEA, также CEACAM5) [165], молекула адгезии эпителиальных клеток (EpcAM) [166].

Все эти антигены в той или иной степени экспрессируются в нормальных тканях, что усложняет поиск антиген-мишени для CAR на солидных опухолях [167]. Так, проведение клинических испытаний CAR-T, специфичных к карбоангидразе IX (которая сверхэкспрессируется в клетках рака почки, но присутствует также и в нормальных тканях, включая печень) выявило

неспецифическую цитотоксичность CAR-T, приведшую к появлению осложнений у пациентов [26, 28]. Кроме того, использование CAR, специфичного к HER2, при метастатическом раке толстой кишки привело к гибели пациента, т.к. сразу после инфузии CAR-T возникла интенсивная и быстрая кросс-реакция на здоровые клетки легких, экспрессирующих HER2 в малых количествах [20].

2.4.2 Иммуносупрессивное микроокружение опухоли

Иммуносупрессивное микроокружение опухоли представляет собой серьезную проблему для разработки новых терапевтических подходов, основанных на адоптивном переносе донорских опухолеспецифических Т-клеток [168]. Часто опухолевые клетки несут поверхностные лиганды для рецепторов Т-клеток, являющиеся иммунными контрольными точками (включая пары лиганд / рецептор: CTLA-4 / CD80, CD86 и PD-1 / PD-L1, PD-L2), которые обычно сдерживают чрезмерно активированные Т-клетки [169]. Применение моноклональных антител специфичных к контрольным иммунным точкам приводит к повторной активации подавленного противоопухолевого иммунитета и последующему уничтожению опухолевых клеток.

2.4.2.1 PD-1/PD-L1 взаимодействие – ключевая точка иммуносупрессии

Трансмембранный ингибиторный рецептор PD-1 (белок запрограммированной клеточной смерти 1, PDCD1 и также известный как CD279) экспрессируется на поверхности активированных В-клеток, Т-клеток и моноцитов. Его взаимодействие с лигандом PD-L1 (CD274) подавляет иммунный ответ и в норме служит для предотвращения аутореактивности иммунной системы [170]. PD-1 по своей структуре является трансмембранным белком I типа, в состав которого входит 288 аминокислотных остатков. Его внеклеточная часть включает в себя домен иммуноглобулинового суперсемейства, а также трансмембранный и внутриклеточный домен (в состав которого входит порядка

95 аминокислотных остатков, иммунорецепторный тирозиновый ингибиторный мотив (ITIM) и иммунорецепторный тирозиновый переключающий мотив (ITSM)) [171].

Связывание PD-1 с его лигандом осуществляет фосфорилирование по двум остаткам тирозина в составе ITIM во внутриклеточном домене. В результате чего появляется возможность привлечения и связывания SHP-1 и SHP-2 – тирозинфосфатаз, содержащих SH-2 домен. Они, в свою очередь, ингибируют активацию Т-лимфоцитов. SHP-1 и SHP-2 имеют возможность связываться с ITIM и ITSM. При этом было показано, что SHP-2 связывается прочнее SHP-1 [172]. Гиперэкспрессия PD-L1 в солидных опухолях подавляет активность цитотоксических Т-лимфоцитов, в результате чего снижается терапевтическая эффективность как опухолеассоциированных Т-лимфоцитов, так и CAR Т-клеток. Гиперэкспрессия PD-L1 характерна для меланомы, рака яичника, немелкоклеточного рака легкого [173].

Нарушить PD-1/PD-L1 взаимодействие можно введением антител, специфичных к PD-1 (например, Пембролизумаб), и его лиганда (они одобрены для лечения различных типов онкологических заболеваний) [25,174]. Связываясь с PD-1, антитела блокируют лиганд-рецепторное взаимодействие, что препятствует подавлению иммунного ответа. Проведенные исследования показали, что сочетанное использование таких антител и CAR-T способствует повышению эффективности лечения [175–177]. В работе [24] на клеточной модели было продемонстрировано, что блокировка PD-1 антителами ведет к повышению уровня экспрессии маркера пролиферации Ki-67, а также к усилению синтеза ИФН γ и гранзима В в модифицированных Т-клетках.

Наряду с введением антител и CAR-T было предложено использовать мембранные везикулы, несущие на поверхности PD-1 [178]. Для их получения была создана линия клеток НЕК экспрессирующих PD-1. Клеточные везикулы получали путем разрушения клеток и выделения из них фрагментов мембран

содержащих рецептора. Везикулы с PD-1 продемонстрировали связывание с клетками меланомы и подавление сигнального пути PD-1/PD-L1.

Также были разработаны и другие способы блокировки взаимодействия PD-1/PD-L1. Например, перенаправление CAR-T на сам лиганд ингибирующего рецептора [179]. При исследовании на клеточных моделях анти-PD-L1 CAR T-лимфоциты показали избирательную цитотоксичность к клеткам с высокой экспрессией PD-1L.

Другой вариант блокирования взаимодействия с PD-L1 – экспрессия CAR T-клетками антител к PD-L1 [26] или PD-1 [27]. В работе Rafiq и соавторы [98] модифицировали CAR-T клетки таким образом, чтобы они секретировали scFv, специфичные к PD-1. Сравнение совместного введения CAR-T и ингибитора взаимодействия PD-1/PD-L1 показало, что CAR-T, секретирующие антитела к PD-1, обладают эффективностью того же или более высокого уровня.

В другой работе CAR-T клетки, секретирующие антитела к PD-L1, также продемонстрировали свою эффективность [26]. На клеточной модели было продемонстрировано, что культивирование CAR T-клеток с таргетными клетками гиперэкспрессирующими PD-L1 способно приводить к истощению T-клеток и потере их функциональной активности. Секреция T-клетками анти-PD-L1 антител, снизила истощение T-лимфоцитов на 50%, а также защитила T-клетки от снижения цитотоксической активности.

Как и другие методы лечения, терапия антителами, нацеленными на PD-1/PD-L1, может приводить к побочным эффектам связанными с иммунной системой, с воспалительными состояниями и сердечной токсичностью. С другой стороны она может привести к потере антигена [180,181]. В ряде исследований были описаны случаи, когда применение PD-1 или PD-L1 блокирующих антител способствовали росту опухоли в клеточных культурах и ксенотрансплантатах [182,183]. Данный результат можно объяснить активацией протеинкиназ В (АКТ) и ERK1/2, которые индуцируют рост опухолевых клеток [183], а также стимуляцией T-регуляторных клеток [182]. Многие экспериментальные данные

были получены в результате краткосрочных экспериментов или наблюдений. В исследовании [184], где блокировали экспрессию PD-1 интерферирующей РНК, ускорилась дифференцировка Т-клеток. Это ещё раз показывает важную роль баланса активирующих и ингибирующих сигналов, а PD-1 играет важную роль в поддержании правильной пролиферации и дифференцировки Т-клеток.

В нашем исследовании блокирование PD-1/PD-L1 будет происходить за счет связывания PD-1 с наноантителом, которое будет ко-экспрессировано вместе CD19 CAR. Согласно нашим ожиданиям, удаление PD-1 с поверхности клетки должно привести к усилению передачи сигналов CAR и более эффективному элиминированию клеток-мишеней.

2.4.3 Молекулярные подходы контроля и регуляции CAR-T

Для обеспечения безопасности CAR-T терапии необходим контроль активности CAR Т-клеток. В настоящее время существуют такие подходы для контроля CAR Т-клеток [29]:

- Использование химически индуцируемой каспазы 9 (Рисунок 3, левая часть). Активация которой, путем введения экзогенной молекулы, запускает апоптотический каскад.
- Использование гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (ТК-ВПГ) в модификации CAR-T (Рисунок 3, правая часть). ТК-ВПГ позволяет введенную извне молекулу ганцикловира превращать из инертной в токсическую.
- Элиминация CAR-T с помощью моноклональных антител (Рисунок 4).
- Ингибирующего сигнала через дополнительный ингибирующий CAR (iCAR), который распознает антиген здоровых клеток (Рисунок 5).
- Нацеливание CAR-T на определенную комбинацию антигенов за счет разделения внутриклеточного домена CAR на два рецептора, что позволяет активировать терапевтические клетки только в присутствии обоих опухолевых антигенов (Рисунок 6).

- Индуцибельная экспрессия CAR за счет индуцибельного промотора или только после распознавания ТАА дополнительным рецептором с активирующимся от взаимодействия транскрипционным фактором (Рисунок 7).
- Использование маскирующего пептида на антигенраспознающем домене химерного антигенного рецептора, который гидролизуется только в микроокружении некоторых типов опухолей (Рисунок 8) [185].
- Временная модификация Т-клеток мРНК, кодирующая CAR [186].
- Использование молекул-посредников, связывающихся с внеклеточным доменом CAR и опухолевым антигеном, выступая тем самым интермедиатом (Рисунок 9).

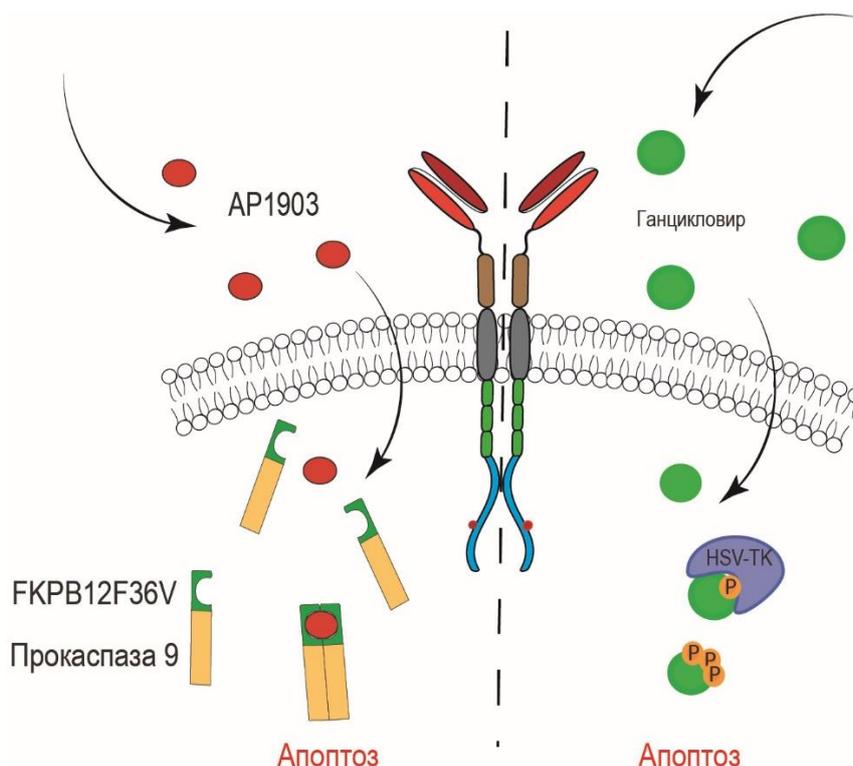


Рисунок 3– Элиминация CAR-T посредством экзогенных молекул. На левой стороне рисунка – элиминация CAR-T с помощью каспазы 9. Усеченный вариант каспазы-9 и фрагмент FK506 димеризуются в присутствии препарата римидуцида (AP1903), это запускает апоптотический каскад. На правой стороне рисунка – элиминация CAR-T с помощью тимидинкиназы вируса простого герпеса, как ТК-ВПГ фосфорилирует ганцикловир до монофосфата, который далее последовательно превращается клеточными киназами в дифосфат и трифосфат. Трифосфатная форма ганцикловира включается в ДНК при элонгации и репликации, что приводит к гибели клетки

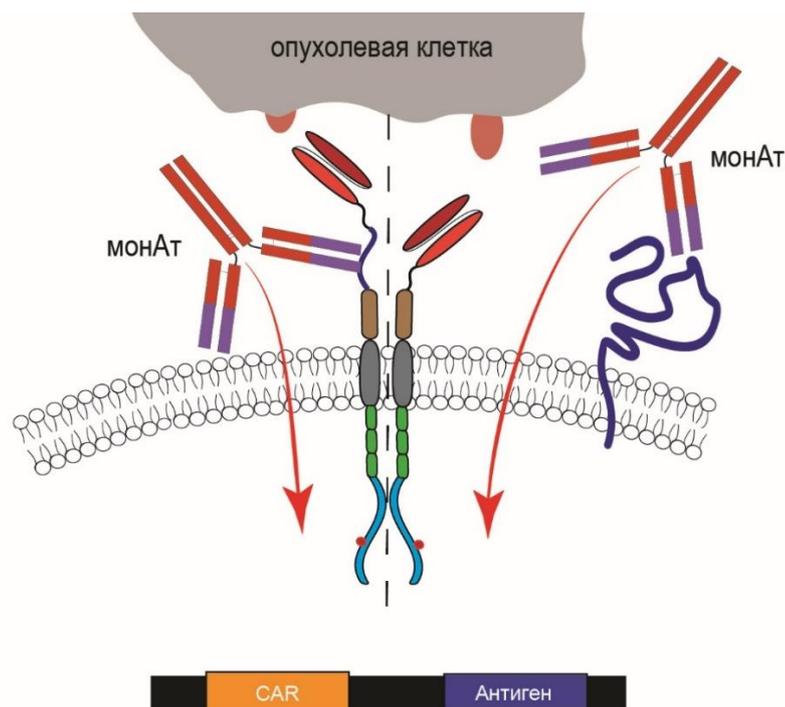


Рисунок 4 – Элиминация с помощью моноклональных антител. На поверхность CAR-T или в шарнирную область CAR добавляется последовательность антигена, на который нацеливают моноклональное антитело. С помощью такого подхода можно элиминировать CAR-T

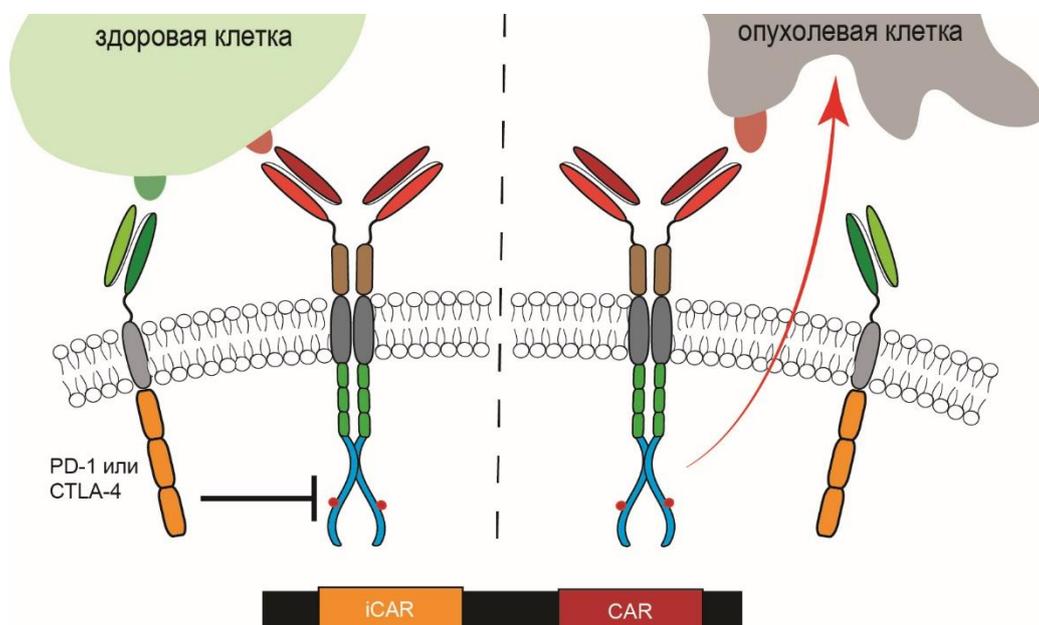


Рисунок 5 – Ингибирующий - iCAR взаимодействует с антигеном здоровой клетки и ингибирует через внутриклеточные домены PD-1 или CTLA-4 CAR. Ингибирование обратимо и позволяет Т-клеткам функционировать при последующей встрече с опухолевой клеткой

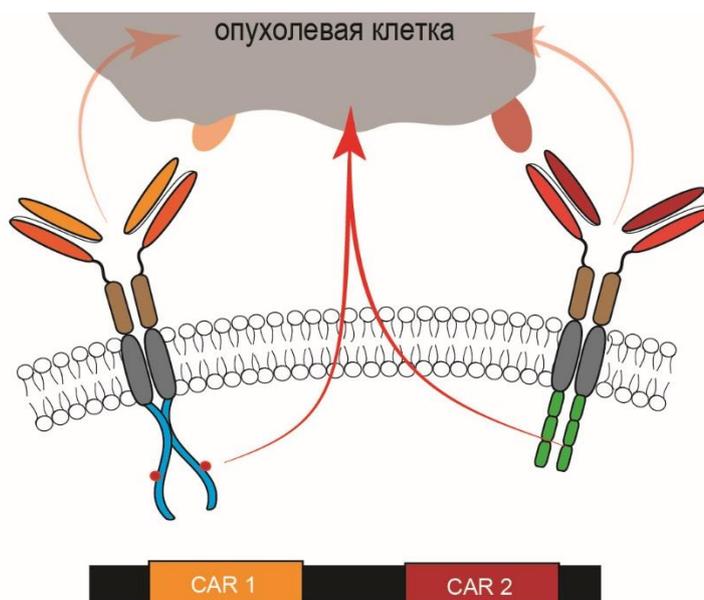


Рисунок 6 – Разбивка CAR на два, специфичных к разным антигенам. Достаточная активация CAR-T происходит только при взаимодействии двух CAR с двумя разными опухолевыми антигенами

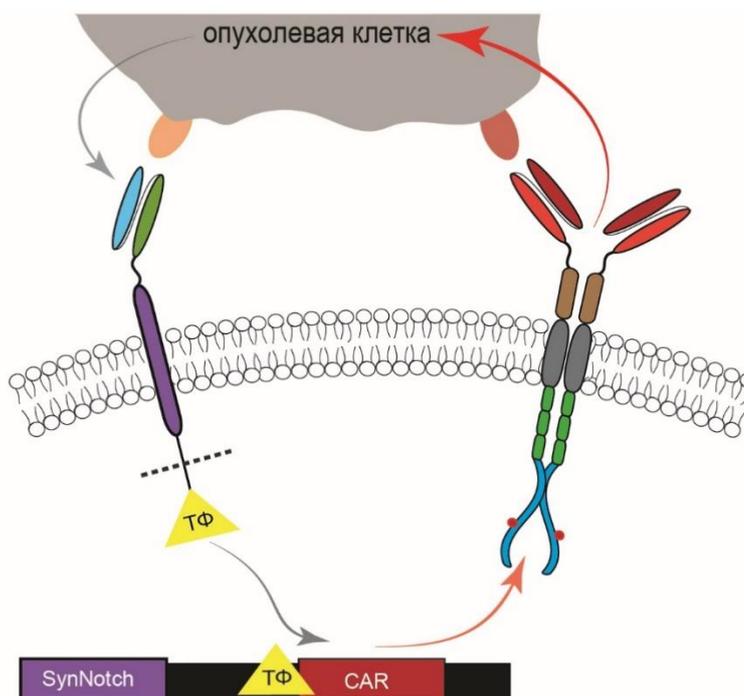


Рисунок 7 – Syn-Notch индуцирует экспрессию CAR. Взаимодействие дополнительного рецептора (Syn-Notch) с одним опухолевым антигеном, запускающее экспрессию CAR через транскрипционные факторы, который, в свою очередь, связывает второй опухолевый антиген и активирует цитотоксичность

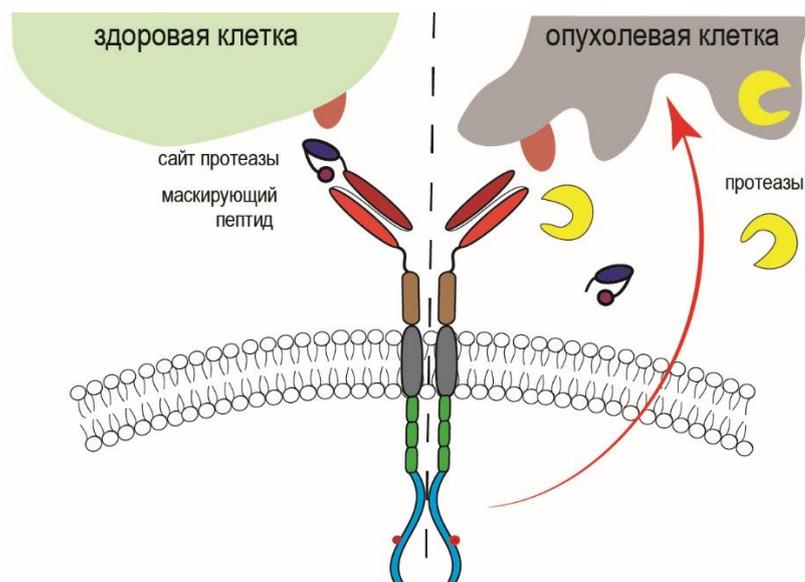


Рисунок 8 – Модификация внеклеточной области CAR маскирующим пептидом, который отщепляется в микроокружении опухоли, что позволяет CAR взаимодействовать со своим антигеном

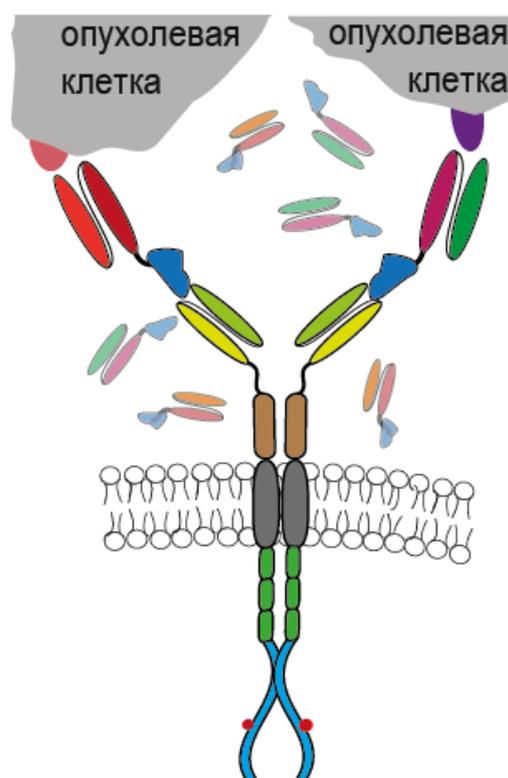


Рисунок 9 – Модульные CAR., активация CAR происходит только через молекулу-посредник, которая одной своей частью распознает ТАА, а ее в свою очередь распознает CAR.

2.4.4 Контроль активности CAR T-клеток с помощью молекул-посредников

Для повышения безопасности применения CAR-T терапии крайне важен контроль активности и специфичности CAR T-клеток. После распознавания антигена CAR-T клетки начинают активно пролиферировать и секретировать провоспалительные цитокины. Модульный подход, который был применен в диссертационной работе, позволяет разделить распознавание антигена и активацию CAR-T на два отдельных контролируемых этапа. Молекулы-посредники – белки или низкомолекулярные соединения, которые одним концом взаимодействуют с опухолевым антигеном, а другим – с CAR-модифицированными T-клетками для образования иммунологического синапса [75, 76]. С помощью молекул-посредников, которые являются переключателями, нацеленными на различные опухолевые антигены, можно активировать и перенаправлять CAR T-клетки. Эта терапевтическая стратегия особенно перспективна в отношении высокогетерогенных солидных опухолей, когда необходимо переключить направленность T-клеточного ответа [78, 79]. Более того, доза переключателей позволяет контролировать интенсивность CAR терапии [190]. Предсказуемая фармакокинетика и фармакодинамика переключателя позволяют контролировать эффекторную функциональность и устойчивость CAR T-клеток. Модульные CAR универсальны и, следовательно, имеют потенциал для широкого спектра клинических применений и существенного снижения стоимости терапии CAR-T-клетками. На сегодняшний день разработан ряд модульных CAR систем. Модульные конструкции содержат димеризующиеся платформы, использующие лейциновые молнии, биотин-авидиновую систему, сортазы, конъюгаты одноцепочечных моноклональных антител с малыми молекулами и др. [187,188,190–195]. В настоящее время проходят клинические испытания три системы переключаемых CAR: hmCD16, UniCAR и PNE. UniCAR и анти-PNE CAR используют молекулу-посредник с

распознающим доменом CAR – одноцепочечные переменные фрагменты, направленные против CD123 [196] или CD19 [190]. В CAR-T против CD16 в качестве молекул-посредников используются клинически одобренные моноклональные антитела – ритуксимаб, трастузумаб, SEA-BCMA [193,197,198], которые обладают терапевтическим потенциалом.

2.4.4.1 Модульная система с использованием неиммуногенного антигена

Для проведения нацеливания на различные ТАА и регулирования активности CAR-T в качестве молекул-посредников могут быть использованы антитела, слитые с неиммуногенным антигеном, к которому специфичны CAR-T, либо CAR, специфичные к Fc-фрагменту терапевтического моноклонального антитела [75–77,80–84]. Данный подход был реализован с помощью рекомбинантных анти-CD19-антител, содержащих неиммуногенный эпитоп дрожжевого фактора транскрипции GCN4, к которому, в свою очередь, был специфичен антигенраспознающий домен CAR-T [190]. Эти же CAR-T удалось перенаправить с помощью антител, специфичных к CD20, модифицированных эпитопом GCN4 [190]. В ходе исследований выявлена прямая зависимость фенотипа CAR-T от концентрации молекул-посредников, когда при низких дозах количество центральных клеток памяти значительно увеличивалось. Помимо антител для распознавания ААО также можно использовать модифицированные природные полипептиды или их фрагменты с гипервариабельными пептидными сегментами, отвечающими за молекулярное узнавание [200].

2.4.4.2 Модульная система с использованием биотин-связывающих CAR-T

Использование хорошо известной аффинной пары – биотин и авидин является еще одним из подходов к созданию модульной системы CAR терапии. В нем распознающий домен представлен димерным авидином, т.к. с мономерным авидином специфический иммунный ответ не был достигнут. Данный CAR может эффективно связывать различные биотинилированные антиген-специфические

молекулы (scFv, mAb или опухолеспецифические лиганды) [188]. В экспериментах *in vitro* к опухолевым клеткам одновременно или перед добавлением CAR-T добавляли биотинилированные нацеливающие молекулы. Такие CAR-T продемонстрировали сравнимый с обычными CAR-T лизис опухолевых клеток и уровень провоспалительных цитокинов. При применении этой системы были получены следующие результаты:

1) дозозависимый ответ, обусловленный количеством добавленных молекул-посредников;

2) при тестировании на группе клеток с различными ТАА, CAR-T нацеливались на антигены, имитируя сценарий ускользания опухолевого антигена;

3) подтверждено значительное ингибирование роста опухоли на мышинной модели рака яичников человека.

Несмотря на это, иммуногенность авидина и стрептавидина является существенным ограничением клинического применения такого рода CAR [201]. Кроме того, в системе избыток биотина не показывал ингибирующий эффект и, следовательно, он не может использоваться в качестве потенциального «выключателя» для дополнительной безопасности.

2.4.4.3 Модульная система с использованием FITC

FITC – флуоресцеин-изотиоцианат, полученный из флуоресцеина, представляет собой флуоресцентную метку, обычно используемую для мечения антител. Tamada и соавторы создали CAR T-клетки специфичные к антителам конъюгированным с FITC [187]. В качестве молекул-посредников они использовали уже применяемые в клинической практике антитела цетуксимаб (анти-EGFR), трастузумаб (анти-HER2) и ритуксимаб (анти-CD20). Tamada и соавторы [187], наряду с другими исследователями, подтвердили эффективность анти-FITC CAR-T с трастузумабом [199]. Однако, первое клиническое использование гуманизованного трастузумаба в составе CAR, привело к

серьезным побочным эффектом – у пациента развилась токсичность вне опухоли на эпителий легких [20].

Также были созданы антитела специфичные к CD19 или фолиевой кислотой, конъюгированной с FITC [191,202].

2.4.4.4 Лейциновые молнии для перенаправления CAR-T

Следующая модульная система состоит из двух частей: (универсального рецептора (zipCAR), экспрессируемого на поверхности Т-клеток, и адаптера scFv, нацеленного на опухоль (zipFv) [192]. zipFv представляет собой scFv слитый с лейциновой молнией, которая взаимодействует с лейциновой молнией zipCAR. Авторы системы, основанной на лейциновых молниях, показали, что активность CAR Т-клеток можно ингибировать с помощью конкурентных zipFv, которые связывают исходный zipFv, но не zipCAR, тем самым предотвращая активацию zipCAR. Была продемонстрирована эффективность платформы zipCAR *in vitro* и *in vivo* [192].

Таким образом, переключаемые CAR представляют собой новую парадигму клеточной терапии, которая позволяет повысить безопасность и универсальность CAR Т-клеток. Данный подход позволит упростить производство CAR Т-клеток и снизить стоимость лечения. Имея средство переключения направления терапии за счет смены молекул-посредников, врачи смогут корректировать лечение. Особенно актуален такой метод для предотвращения рецидивов после возникновения мутаций, которые приводят к исчезновению целевого опухолевого антигена, а также для эффективной терапии опухолей с гетерогенной экспрессией антигенов [189–191]. Тем не менее, возможность использования молекул-посредников в терапии солидных опухолей остается под вопросом, т.к. их способность к проникновению в ткань опухоли ограничена, что снижает эффективность локальной активации и функционирования CAR-T, в то время как классические CAR-T способны мигрировать в ткань опухоли [87, 88].

2.4.4.5 Модульная система с использованием молекулы-посредника на основе бараназы и барстара

Для успешного применения модульной системы CAR-T необходима молекула-посредник, которая обладает следующими характеристиками:

- высокая аффинность к антигенраспознающему домену CAR;
- высокая специфичность к опухолевому антигену;
- небольшие размеры, для сохранения стабильности и высокой способности проникновения в область опухоли;
- низкая иммуногенность.

В целях формирования высокоспецифичного распознавания опухолевых антигенов в качестве составной части молекулы-посредника могут использоваться различные варианты антител – полноразмерные, укороченные или одноцепочечные, в том числе scFv или миметики антител [205]. Миметики антител имеют необходимые для молекулы-посредника размеры, поэтому их можно применить для создания регулируемых CAR. Из известных альтернативных миметиков антител в диссертационной работе были использованы дарпины (DARPin). Дарпины – это повторы анкиринов, одних из наиболее распространенных в природе классов связывающих белков, которые отвечают за структурную целостность клетки и передачу сигналов между клетками. Дарпины имеют высокоспецифичное и высокоаффинное связывание мишени, устойчивы к денатурации и протеолизу, термостабильны (температура плавления некоторых представителей достигает +90°C) и хорошо нарабатываются в бактериальных системах (до 200 мг белка на 1 л жидкой культуры) [206]. Молекулы дарпина содержат как минимум 3 плотноупакованных повтора из 33 аминокислот, шесть из которых образуют связывающую поверхность [207]. Для создания молекул-посредников нами были выбраны два дарпина специфичных к HER2, один из которых связывается с наиболее удаленным от мембраны с

константой $K = 3.8 \text{ нМ}$ [208], а другой – с четвертым субдоменом HER2 (ближайшим к клеточной мембране) с константой $K = 0,07 \text{ нМ}$ (Рисунок 10) [209].

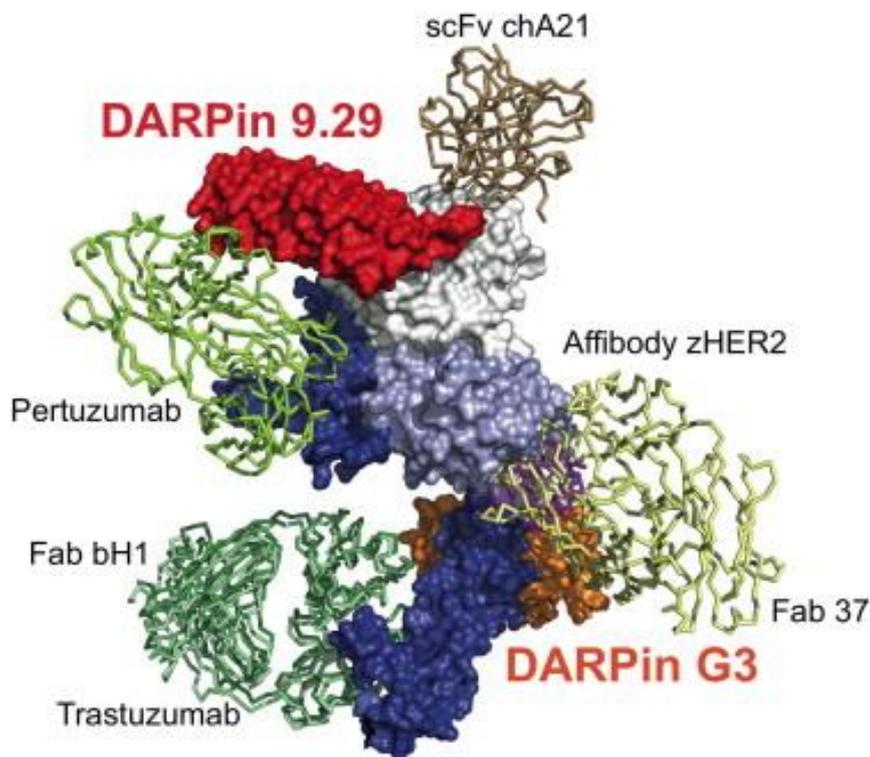


Рисунок 10 – Расположение эпитопов связывания двух дарпинов – 9.29 (красный), G3 (оранжевый) на HER2 (из банка данных по белкам (Protein Data Bank)) [210]

В качестве димеризующего агента между направляющей молекулой и CAR перспективны РНКазы и их белок-партнер – ингибитор РНКазы. РНКазы образуют плотный и специфический комплекс со своим белковым ингибитором. Одной из таких молекулярных пар является РНКаза – барназа, и ее партнер-барстар, блокатор РНКазной активности барназы. Данная пара белков была выбрана нами для экспериментов благодаря своим нескольким уникальным свойствам. Во-первых, барназа и барстар имеют высокую специфичность и аффинность друг к другу ($K_a = 10^{14} \text{ М}^{-1}$), что обеспечивает быстрое и селективное взаимодействие [211–214]. Такое сильное взаимодействие сравнимо со взаимодействием биотина и стрептавидина [215]. Во-вторых, область связывания барназы и барстара не включает их N- и C-концевые участки. Поэтому каждый из

этих белков можно легко объединить генно-инженерными методами в одну полипептидную цепь с фрагментами антител (Рисунок 4) [212]. В-третьих, за счет своей компактности, барназа – 18 кДа (110 а.о.) и барстар – 11 кДа (89 а.о.), обладают высокой стабильностью [216]. Таким образом, при объединении направляющей молекулы-дарпина с барназой получается молекула-посредник между опухолевой клеткой и CAR-T. В состав распознающей части такого CAR входит барстар (BsCAR). Меняя молекулы-посредники с разной специфичностью можно перенаправлять одни и те же BsCAR-T на разные ТАА.

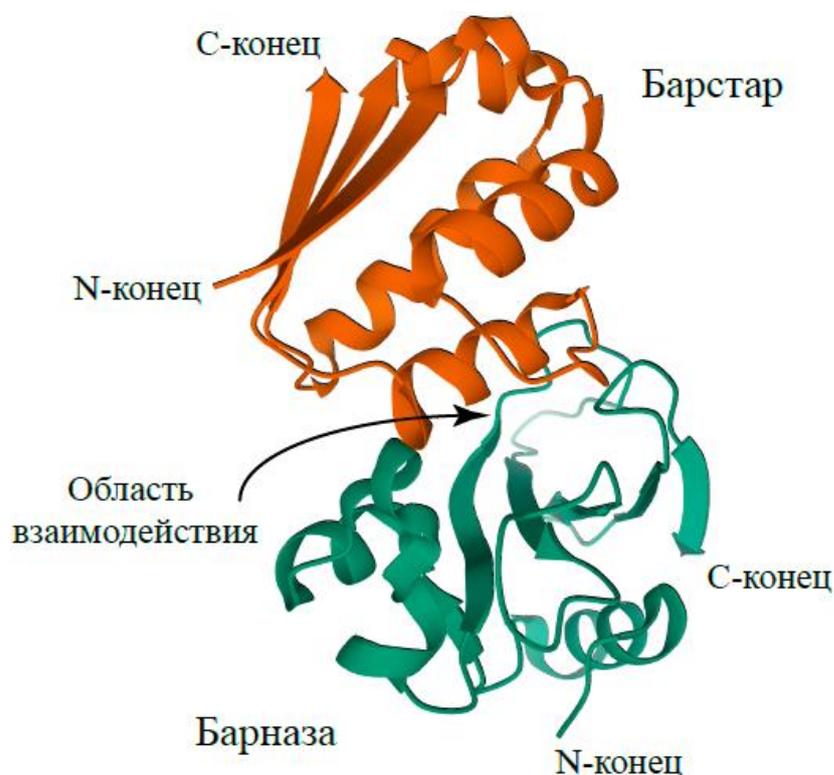


Рисунок 11 – Пространственная структура комплекса барназа-барстар
(адаптировано из [216])

Кроме этого, за счет панели молекул-посредников с разным распознающим доменом можно не только менять специфичность, но также можно регулировать аффинность и авидность. Модулировать такие параметры особенно важно в отношении опухолей, целевой антиген которых распространен по всему организму. Например, CAR с scFv анти ErbB2 (HER2) с K_D (константа диссоциации) 0,3 мкМ показали избирательную цитотоксичность против клеток с высокой экспрессией ErbB2, в то время, как CAR с scFv с высоким сродством (K_D

<0,01 мкМ) к ErbB2 – нет [217]. В других примерах, уже *in vivo*, достигли лучших терапевтических показателей с CAR с микромолярным K_D к ErbB2, EGFR, CD38, ICAM-1 на опухолевых клетках со сверхэкспрессией этих антигенов по сравнению с CAR, у которых более аффинные распознающие домены [218–221]. Несмотря на то, что проведенные исследования подтверждают факт улучшения специфичности CAR Т-клеток при воздействии на них низкоаффинными лиганд-распознающими доменами, в некоторых случаях это может привести к снижению противоопухолевой активности. Так, CAR-T против опухолевых клеток с ROR1 и FR β показали свою эффективность только с высокоаффинными распознающими доменами [50,222]. В другом исследовании – CAR против GD2 с scFv с низким сродством, были неэффективны при лечении быстро пролиферирующих опухолей, в то время как scFv с высоким сродством обладал значительной противоопухолевой активностью. Однако, повышенная чувствительность и эффективность также привели к серьезной нейротоксичности из-за неспецифических эффектов вне опухоли [223]. Следовательно, аффинность связывания CAR с ТАА необходимо оптимизировать уравниванием желаемой силы противоопухолевого ответа и потенциального риска токсичности против мишени вне опухоли. Наконец, пороги аффинности, вероятно, не универсальны и зависят от взаимосвязанных факторов, таких как плотность антигена в клетках-мишенях, уровня экспрессии CAR у Т-клеток, а также расположения связывающего эпитопа [224,225].

В настоящее время CAR-T технология быстро развивается. Перспективными становятся такие направления как, увеличение репертуара специфичности CAR для лечения разных видов опухолей, в том числе и гетерогенных, преодоление побочных эффектов при CAR-T терапии. А для этого необходимо иметь возможность выключения активности CAR-T, а также способ регулирования активности введенных терапевтических клеток. Использование молекул-посредников не только позволит регулировать активность CAR-T, но также и перенаправлять CAR-T на разные антигены, заменяя специфичность

молекулы-посредника, а не CAR-T. Кроме того, необходима разработка CAR-T, устойчивых к иммуносупрессивному влиянию микроокружения опухоли.

3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1 Список используемых реактивов и наборов

Агар-агар (Difco, Великобритания);

Агароза (Helicon, Россия);

Азид натрия (NaN_3) (Helicon, Россия);

Ампициллин (Helicon, Россия);

Бромистый этидий (Helicon, Россия);

Гидроксид натрия (Helicon, Россия);

Глюкоза (Helicon, Россия);

Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP) 50X (Евроген, Россия);

Диметилсульфоксид (ДМСО) (Helicon, Россия);

Дрожжевой экстракт (Difco, Великобритания);

Изопропиловый спирт (ХИММЕД, Россия);

Интерлейкин-2 (IL-2) (PAN-Biotech, Германия);

Интерлейкин-2 (IL-2) (SCI-store, Россия);

Полибрен (Millipore, США);

Полиэтиленимин (PEI) (Sigma-Aldrich, США);

ПЦР-микс (Евроген, Россия);

Триптон (Difco, Великобритания);

Трисгидроксиметиламинометан (трис) (Helicon, Россия);

Уксусная кислота (ХИММЕД, Россия);

Фиколл (ПанЭко, Россия);

Фосфат калия однозамещенный (KH_2PO_4) (Helicon, Россия);

Фосфат натрия двузамещенный (Na_2HPO_4) (Helicon, Россия);

Хлорид калия (KCl) (Helicon, Россия);

Хлорид магния (MgCl_2) (Helicon, Россия);

Хлорид натрия (NaCl) (Helicon, Россия);

Этилендиаминтетраацетат (ЭДТА, EDTA) (Helicon, Россия);

Cleanup Standard (Евроген, Россия);

CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, США);

Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 (Invitrogen, США);

Dynabeads™ Untouched™ Human T Cells Kit (Invitrogen, США);

Полибрен (Millipore-Sigma, США);

Plasmid Midiprep 2.0 (Евроген, Россия);

Plasmid Miniprep (Евроген, Россия);

QUANTI-Luc™ (Invivogen, США);

гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ (Вектор-Бест, Россия);

Интерлейкин-2-ИФА-БЕСТ (Вектор-Бест, Россия);

Q5® High-Fidelity DNA Polymerase, Q5® Reaction Buffer 5X и Q5® High GC Enhancer (New England Biolabs, Великобритания);

T4 DNA Ligase и T4 DNA Ligase Buffer (ThermoScientific, США);

T4 ДНК лигаза и Quick ligation буфер (Евроген, Россия);

Tersus polymerase 50X и Tersus Plus Buffer 10X (Евроген, Россия);

ScreenMix 5X (содержит полимеразу, буфер, dNTP и краску для внесения в гель) (Евроген, Россия)

Эндонуклеазы рестрикции и соответствующие стандартные буферные растворы (ThermoScientific, США; New England Biolabs, Великобритания).

Вода MQ стерильная

Промывочный раствор (Phosphate-buffered saline (PBS) <R> (pH 7.4))

Элюирующий раствор (Glycine (0.1 M, pH 2 or 3))

Нейтрализующий раствор (Tris-HCl (2 M, pH 8)

3.2 Растворы и среды для культивирования

Все растворы готовились на деионизованной воде особой чистоты (MQ) Milli-Q® IQ 7003/7005 Water Purification System (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;

PBS, NaN₃ 0,05%: 500 мл 10X PBS + 2,5 мг NaN₃;

TAE 50X: 242 г/л трис, 57,1 мл уксусная кислота, 100мл 0,5 М ЭДТА, pH 8,5;

TBE 10X: 0,89 М трис, 0,89 М борная кислота, 20 мМ ЭДТА, pH 8,0.

3.2.1 Растворы для культивирования бактерий

2YT: 16 г/л триптон, 10 г/л дрожжевой экстракт, 5 г/л NaCl;

2YT-агар: 2YT + 18 г/л агар;

Lauria-Bertani (LB): 10 г/л триптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 10 г/л NaCl;

LB-агар: LB + 18 г/л агар;

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

3.2.2 Среды для культивирования эукариот

DMEM (ПанЭко, Россия);

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco®, Великобритания);

GlutaMAX 100X (Gibco®, Великобритания);

Heat Inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco®, Великобритания);

Optimal Minimum Essential Medium (Opti-MEM) (Gibco®, Великобритания);

Phosphate-Buffered Saline (PBS) 1X (Gibco®, Великобритания);

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco®, Великобритания);

RPMI 1640 (ПанЭко, Россия);

Sodium Pyruvate 100mM (Gibco®, Великобритания);

Trypsin-EDTA (0,05%), phenol red (Gibco®, Великобритания);

Антибиотик-Антимикотик 100X (Gibco®, Великобритания);

Краска трипановый-синий (Bio-Rad);

Среда культуральная FreeStyle 293;

Среда культуральная Oriem.

3.3 Работа с нуклеиновыми кислотами

3.3.1 Дизайн конструкций

Фрагменты ДНК, кодирующие химерный антиген Т-клеточного рецептора третьего поколения, анти-PD1 наноантитело 102c3 (VHH), слитое с трансмембранным PDGFR, содержащим спейсерный домен Fc IgG1 с модифицированными мотивами PELLGG и ISR или гибкий короткий шарнир $(G_4S)_3$ и P2a-VHH-PEBL (мотив PEBL для внутриклеточного [226] (в ЭПР, или в

аппарате Гольджи) блокирования) были синтезированы (GeneCust), нуклеотидная последовательность PD-1 и PD-L1 человека были получены методом обратной транскрипции из клеток периферической крови. Полученные фрагменты ДНК клонированы в лентивирусный вектор pLV2 (Clontech) под контролем промотора EF1a. Последовательность наноантитела 102с3 к PD-1 была создана и любезно предоставлена Степаном Петровичем Чумаковым (ИБХ РАН). Расположение генов CAR от N до C-конца было следующим: сигнальный пептид интерлейкина-2 (ИЛ-2), CD19-специфический scFv (полученный из гуманизированного антитела мыши FMC63), шарнир и трансмембранная область от CD8, внутриклеточные домены CD28, 4-1BB и CD3zeta (CAR19). Конструкция CAR19-P2a-VNN-PEBL была изготовлена перекрывающимся ПЦР.

Нуклеотидная последовательность Bs-CAR: сигнальный пептид интерлейкина 2, барстара (была любезно предоставлена С.М. Деевым (ИБХ РАН)), шарнирный домен Fc IgG4 (CH2-CH3), трансмембранная область и внутриклеточный домен CD28, внутриклеточная область OX-40 и CD3 ζ . Нуклеотидная последовательность дарпина EC1 была произведена из его аминокислотной последовательности, как было описано в публикации Stefan [227]. Нуклеотидная последовательность гена дарпина G3 была получена из аминокислотной последовательности DARPin G3, депонированной в PDB (номер PDB: 2JAB), как описывалось ранее [228]. Плазмида pET39b содержала ген барстара под своим естественным промотором. Гены, кодирующие дарпин 9.29-барназа-His5, дарпин G3-барназа-His5, и дарпин EC1-барназа-His5, были клонированы в вектор pET39b между сайтами рестрикции NdeI и HindIII, как было описано ранее для дарпин 9.29-барназа-His5 [229].

Дизайн комбинаторной пептидной библиотеки и CAR (Рисунок 13А): фрагмент ДНК, кодирующий CAR третьего поколения, был синтезирован (GeneCust) и клонирован в лентивирусный вектор pLV2 (Clontech) под контролем промотора фактора элонгации 1a (EF1a). Расположение нуклеотидных последовательностей от N-конца было следующим: сигнальный пептид

интерлейкина-2 (IL-2), спейсерный домен IgG1 Fc с модифицированными мотивами PELLGG и ISR, линкер GGGS, трансмембранная и внутриклеточная область CD28 и внутриклеточные домены OX-40 и CD3 ζ (Рисунок 12 А и 12 В). Для создания комбинаторной библиотеки циклопептидов в составе CAR были использованы олигонуклеотиды с вырожденными кодонами NNK (CX₇C (X = 20 природных аминокислот)). Разнообразие созданной библиотеки составило 10⁹ вариантов.

Для создания клеток опухоли, которые можно прижизненно визуализировать в животных, использовалась плаزمиды с бицистронным вектором, где под первым CMV промотором стоит люцифераза светлячка (FLuc), а под вторым – ген устойчивости к гигромицину. Эта лентивирусная плаزمиды рCDH FLuc_Nygro была любезно предоставлена лабораторией Ричарда Лернера Научного Института имени Эллен Браунинг Скриппса (Сан-Диего, США).

3.3.2 Амплификация ДНК-фрагментов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Для проведения ПЦР использовали амплификатор T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США) и реакционную смесь представленную в таблице 2.

Таблица 2 – Состав ПЦР смеси

Для Q5 полимеразы (NEB, Великобритания)	Для Tersus полимеразы (Евроген, Россия)
Q5® Reaction Buffer 5X	Tersus Plus Buffer 10X
dNTP 50X	dNTP 50X
праймер на начало ДНК-фрагмента	праймер на начало ДНК-фрагмента
праймер на конец ДНК-фрагмента	праймер на конец ДНК-фрагмента
Q5® High GC Enhancer	Tersus polymerase 50X
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	ДНК-фрагмент (от 10 нг)
ДНК-фрагмент (от 10 нг)	MQ
MQ	

Амплификацию проводили в объеме 50 мкл по схеме, указанной в таблице 3.

Таблица 3 – Программа ПЦР амплификации

Стадия	Температура, время	Количество циклов
Предварительная денатурация	+95°C, 3 мин	1
Денатурация	+95°C, 20 с	25
Отжиг праймеров	+X°C, 20 с	
Элонгация	+72°C, Y с	
Элонгация	+72°C, 5 мин	1
$X = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$, где А, Т, G, С, соответственно, аденин, тимин, гуанин, цитозин; или рассчитанное автоматически в программе SnapGene (США). Для праймеров, длиной области отжига более 24 нуклеотидов, использовали температуру отжига +68°C или максимальную возможную температуру, определенную экспериментально		
$Y = l / U$, где l – длина ДНК-фрагмента, U – скорость работы соответствующей полимеразы (Q5 [®] High-Fidelity DNA Polymerase – 2000 п. о./мин, Tersus polymerase – 1500 п. о./мин)		

3.3.3 Электрофорез ДНК в агарозном геле

Для проведения электрофореза была использована камера Owl[™] EasyCast[™] B2 Mini Gel Electrophoresis Systems (ThermoScientific, США). Гель готовили на основе ТАЕ буферного раствора с добавлением 0,8 – 1,5% агарозы и 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Электрофорез был осуществлен в буфере ТАЕ при силе тока 150 мА.

Для оценки результатов гель помещали в трансиллюминатор и визуализировали в УФ свете при длине волны 254 нм (ЛКВ, Германия). Если было необходимо, вырезали нужный фрагмент и очищали с помощью набора Cleanup Standart (Евроген). Для оценки и документирования результатов использовали трансиллюминатор VersaDoc[™] MP4000 Imaging System (Bio-Rad, США).

3.3.4 Рестрикция

Для выполнения рестрикции добавляли от 200 до 1500 нг плазмидной ДНК или ПЦР продукта к реакционной смеси до общего объема 50 мкл, приготовленной согласно рекомендациям производителей эндонуклеаз рестрикции с использованием стандартных буферов. При температуре +37°C в течение 30 – 90 мин (в зависимости от рекомендаций производителя и длины ДНК-фрагментов) инкубировали смесь. Для оценки результатов рестрикции использовали электрофорез продукта в агарозном геле. Для очистки фрагментов от геля использовали набор Cleanup Standart.

3.3.5 Лигирование

Для проведения лигирования добавляли ДНК-фрагмент к 50 нг плазмидной ДНК после рестрикции при молярном соотношении вектора и вставки 1:3. Лигирование выполняли при помощи T4 DNA Ligase и соответствующего буфера в объеме 20 мкл в течение 1 ч при комнатной температуре. С T4 ДНК-лигазой и Quick ligation буфером 15 мин по протоколу производителя. Для предварительной оценки успешности клонирования на этапе трансформации параллельно проводили контрольный эксперимент по количеству выросших колоний без ДНК-вставки.

3.3.6 Трансформация *E.coli* методом теплового шока

Для проведения химической трансформации использовался штамм компетентных клеток *E.coli* XL1-Blue (Евроген, Россия). Пробирки с компетентными клетками помещали на лед до полного размораживания содержимого из расчета одна пробирка на трансформацию. Суспензию клеток аккуратно перемешивали легким встряхиванием. Добавляли в каждую пробирку

образец ДНК (плазмидная ДНК, продукты лигирования и т.д.). Содержимое снова аккуратно перемешивали легким встряхиванием. Пробирки инкубировали во льду в течение 30 мин. Затем их переносили в разогретый термостат (Biosan, Латвия) (+42°C) на 45 сек. Далее из водяной бани пробирки быстро перемещали в лед и инкубировали в течение 5 мин. После этого в пробирки добавляли не менее 3-х объемов предварительно подогретой до температуры +37 – +42°C среды SOB или SOC, перемешивали содержимое и инкубировали при температуре +37°C в течение 40 – 60 мин. Содержимое пробирок высевали на чашки Петри с 2YT-агаром, содержащим селективный антибиотик (ампициллин 1000X). Используя стерильный шпатель равномерно распределяли трансформированные клетки по поверхности агара. Давали чашкам Петри полностью высохнуть в полуоткрытом состоянии. Затем их помещали в суховоздушный термостат (Memmert, Германия) и инкубировали в течение 14 – 16 ч при температуре +37°C.

3.3.7 Оценка клонирования методом ПЦР с колоний

Чашку Петри с выросшими колониями с предполагаемой вставкой сравнивали с чашкой Петри, на которую высевали бактерии, трансформированные лигазной смесью без вставки. Если соотношение было не сильно в пользу / не в пользу колоний со вставкой, то делали ПЦР с колонией.

Под ламинатором отмечали номер колонии с обратной стороны чашки Петри. Затем колонию скалывали сначала в пробирку с 10 мкл MQ, а потом в пробирку со смесью для ПЦР. Далее пробирку MQ с клонами использовали для высевания на чашку Петри и наработки плазмиды в ночной культуре избранных вариантов, подтвержденных ПЦР, со вставкой.

Проводили ПЦР в смеси: праймер на ДНК-вставку, праймер на ДНК-вектор, ScreenMix 5X. Скол клона с чашки Петри после трансформации доводили в MQ до объема 15 мкл. Амплификацию проводили согласно схеме (Таблица 4).

Таблица 4 – Программа ПЦР скрининга колоний

Стадия	Температура, время	Количество циклов
Предварительная денатурация	+95°C, 3 мин	1
Денатурация	+95°C, 20 с	25
Отжиг праймеров	+X°C, 20 с	
Элонгация	+72°C, Y с	
Элонгация	+72°C, 5 мин	1
$X = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$, где А, Т, G, С, соответственно, аденин, тимин, гуанин, цитозин; или рассчитанное автоматически в программе SnapGene (США)		
$Y = l / U$, где l – длина ДНК-фрагмента, U – скорость работы соответствующей полимеразы (Q5 [®] High-Fidelity DNA Polymerase – 2000 п. о./мин, Tersus polymerase – 1500 п. о./мин)		

Результаты ПЦР проверяли путем электрофореза полученного продукта в агарозном геле. В данном эксперименте буфер для внесения к образцам не добавляли, так как смесь-ScreenMix уже содержала необходимые компоненты.

3.3.8 Выделение плазмидной ДНК

Бактерии из чашки Петри или из смеси с MQ переносили в 5 мл 2YT с добавлением селективного антибиотика (ампициллин 1000X) и инкубировали 16-20 ч, при температуре +37°C, постоянно перемешивая в суховоздушном термостате (Mettler, Германия) со скоростью 220 об/мин. Осаждали культуру центрифугированием в течение 15 мин на скорости 3000 g при температуре +4°C в Centrifuge 5810R (Eppendorf, Германия). Для выделения ДНК из осадка использовали набор Plasmid Miniprep в соответствии с инструкцией производителя и с использованием соответствующего оборудования. Готовые образцы плазмидной ДНК отдавали для секвенирования в компанию Евроген для подтверждения правильной последовательности нуклеотидов.

Используя набор для выделения плазмид Plasmid Midiprep (Евроген), из 50 мл бактериальной культуры получали необходимое для трансфекции количество

плазмиды. Таким образом были получены упаковочные плазмиды: pCMV-VSV-G (Addgene, США); pRRE-GAG (Addgene, США); pRSV-Rev (Addgene, США).

3.4 Работа с белками

3.4.1 Продукция дарпин-барназы

Рекомбинантный штамм *E. coli* BL21(DE3), трансформированный соответствующей плазмидой (pET39b с дарпин 9.29-барназа-His5, или дарпин G3-барназа-His5, или дарпин EC1-барназа-His5), выращивали на аутоиндукционной среде ZYM-5052 с добавлением канамицина (50 мг/л) при температуре +25°C на качалке в 2,5-литровых колбах объемом не более 300 мл. Биомассу ресуспендировали в растворе, содержащем 100 mM Tris-HCl, 250 mM сахарозы, 0,5 mM ЭДТА, pH 8,0, 0,5 mM PMSF, и добавляли лизоцим до конечной концентрации 30 мкг/мл. Через 30 мин клеточную суспензию обрабатывали ультразвуком 5 раз по 10 с при мощности 60 Вт с интервалом 2 – 4 мин на ледяной бане при перемешивании. Полученный клеточный лизат центрифугировали 30 мин на скорости 18500 g. Супернатант, содержащий растворимую фракцию целевого белка, декантировали и фильтровали через мембрану с размером пор 0,22 мкм (MilliporeSigma). Раствор, содержащий целевой белок, со скоростью 5 мл/мин наносили на колонку HisTrap HP объемом 5 мл, уравновешенную 10 объемами раствора I (20 mM NaPi, pH 7,5, 500 mM NaCl) с 30 mM имидазола. Колонку со скоростью 5 мл/мин промывали 10 объемами раствора I, содержащего 30 mM имидазола. Для денатурации комплекса дарпин-барназа-барстар, иммобилизованного на колонке со скоростью 1 мл/мин, промывали 25 объемами раствора I с 6 M гидрохлорида гуанидина. Затем свободный от ингибитора-барстара дарпин-барназу ренатурировали прямо на колонке линейным нисходящим градиентом (60 объемов колонки) гидрохлорида гуанидина 6 M – 0 M со скоростью 1 мл/мин. После этапа ренатурации колонку

промывали 10 объемами раствора II (20 мМ NaPi, pH 7,5, 100 мМ NaCl) со скоростью 5 мл/мин. Дарпин-барназы элюировали с колонки раствором II, содержащим 250 мМ имидазола, с той же скоростью. Элюат, полученный после аффинной хроматографии, разбавляли раствором III (20 мМ NaPi, pH 7,5) в 5 раз и наносили на колонку HiTrap Q HP объемом 5 мл, уравновешенную 10 объемами раствора III, со скоростью 5 мл/мин. Колонку промывали 10 объемами раствора III, а затем элюировали дарпин-барназу со скоростью 5 мл/мин линейным градиентом NaCl (0-500 мМ) в растворе III. Объем градиента составлял 20 объемов колонки. Фракции, содержащие дарпин-барназу, объединяли и стерилизовали фильтрованием через мембрану 0,22 мкм. Концентрацию белка определяли с помощью УФ-спектроскопии, используя $\epsilon_{280} = 29870 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для дарпина 9.29-барназа-His5 (молекулярная масса 31411 Да), $\epsilon_{280} = 28590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ – для дарпина G3-барназа-His5 (молекулярная масса 28099 Да), и $\epsilon_{280} = 41250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ – для дарпина EC1-барназа-His5 (ММ 31852 Да).

3.4.2 Меченье белков FITC

Меченые дарпины 9.29-барназы, FITC барназы G3-барназы и трастузумаб (Roche) получали следующим образом. 100 мкг белка в 90 мкл буфера PBS быстро смешивали с 10 мкл FITC в ДМСО в концентрациях 1 г/л, 1 г/л, 1 г/л и 0,3 г/л соответственно. Белки инкубировали в течение ночи при комнатной температуре и очищали от непрореагировавших молекул FITC с помощью колонок Zeba Spin Desalting Columns, MWCO 7k (Pierce, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

3.4.3 Проверка РНКазной активности барназы

Рибонуклеазную активность белков определяли методом кислоторастворимых остатков с использованием дрожжевой РНК, как было

описано ранее [230]. Исследуемый образец белка растворяли в концентрации 2 мкМ в 0,125 М Tris-HCl, pH 8,5, после чего готовили серию последовательных 3-кратных разведений образца в том же буфере. В качестве контрольного образца использовали 0,125 М раствора Трис-HCl, pH 8,5. 40 мкл белка в 0,125 М Tris-HCl, pH 8,5 смешивали со 160 мкл дрожжевой РНК в концентрации 2 г/л на льду. Реакционную смесь инкубировали 15 мин при температуре +37°C. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл холодной 6% хлорной кислоты. Затем смесь инкубировали 15 мин при температуре 0°C. При инкубации с хлорной кислотой крупные фрагменты РНК образовывали осадок, который центрифугировали при 16000 g в течение 10 мин при температуре 0°C. Супернатанты разбавляли в 20 раз и измеряли оптическую плотность при 260 нм с использованием планшет-ридера Infinite M1000 Pro (Tecan) в планшетах, прозрачных для УФ-видимой области. EC_{50} был рассчитан с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

3.4.4 Иммуноферментный анализ

3.4.4.1 Иммуноферментный анализ цитокинов

Иммуноферментный анализ (ИФА) цитокинов, выделяемых CAR-T, проводили следующим образом. В 96-луночном планшете в количестве 5000 кл./лунку рассеивали BT474, экспрессирующие HER2. Через 4 ч, необходимые для прикрепления клеток к подложке, добавляли активированные (не-) трансдуцированные Т-лимфоциты в количестве:

- для титрования дарпин-барназы – 50000 кл./лунку (дарпин-барназа – в концентрации 5 нМ в верхней точке),
- для титрования CAR-T – 200000 кл./лунку в верхней точке (дарпин-барназа – в концентрации 1 нМ).

После чего клетки совместно инкубировались в течение 24 ч. Далее отбирали супернатант, очищали его от оставшихся клеток на центрифуге

Centrifuge 5804R (Eppendorf, Германия) 8 мин при комнатной температуре на скорости 1394 об/мин. Супернатант замораживали или приступали непосредственно к самому ИФА. В проводимых экспериментах были применены наборы для ИФА производства Вектор-Бест, Россия.

В 96-луночный планшет к носителю с антителами, иммобилизованными первичным слоем (антитела I), добавляли раствор, в котором содержалось анализируемое вещество в разной концентрации (антиген). На первой стадии инкубировали на твердом носителе, чтобы образовывался комплекс антитело-антиген. После этого не связавшиеся компоненты отмывали от твердого носителя, добавляли специфические антитела (антитело II) и инкубировали. Далее отмывали несвязанные остатки и добавляли к вторичным антителам ферментативно-меченные антитела (антитело-K). Инкубировали, а затем удаляли избыток меченых антител. Далее определяли ферментативную активность на носителе в разных точках, которая прямо зависела от начальной концентрации определяемого вещества в каждой точке. Для проведения цветной ферментативной реакции использовали перекись водорода и субстрат – бесцветное соединение, которое окисляется до окрашенного продукта при разложении пероксида.

На заключительной стадии результат спектрофотометрически оценивали на приборе Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, США).

3.4.4.2 Иммуноферментный анализ циклопептидов

Фрагменты ДНК (кодирующие отобранные циклопептиды ФЛ1, ФЛ2 и ФЛ3) были синтезированы в компании Евроген (Россия) и клонированы в вектор M13KE (NEB). Клонированные циклопептиды амплифицировали в формате фагов с использованием электрокомпетентных клеток ER2738 (NEB) в соответствии с рекомендациями производителя. ИФА выполняли на микротитровальных планшетах MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Дания). Относительную специфичность растворимых циклопептидов ФЛ1, ФЛ2 и ФЛ3 в формате фагов оценивали в

отношении восстановленных рекомбинантных В-клеточных рецепторов лимфомы в формате растворимых антител. 96-луночные планшеты покрывали растворимой формой (5 мкг/мл) В-клеточного рецептора лимфомы (ФЛ1 Ат, ФЛ2 Ат и ФЛ3 Ат) в карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 8,6) в течение ночи при температуре +4°C. Далее их блокировали фосфатно-солевым буфером (PBS) с 4% сухого обезжиренного молока. Примерно 10^{10} вирионов на лунку, растворимых ФЛ1, ФЛ2 и ФЛ3, из ночной культуры клеток, инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре, а затем трижды промывали PBS с Tween 20. Циклопептиды ФЛ1, ФЛ2 и ФЛ3 в фагах были обнаружены путем инкубации с 10000-кратным разведением анти-M13-антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) (№ 27-9421-01, GE Healthcare), в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки в каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора тетраметилбензидина и помещали планшет в темноту на 5–15 мин. Реакцию останавливали, добавляя по 50 мкл 10%-ной ортофосфорной кислоты на лунку. Результаты оценивали путем измерения значений OD_{450} (оптическая плотность при 450 нм) в устройстве для считывания микропланшетов Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, США).

3.4.5 Поверхностный плазмонный резонанс

Все измерения проводились с использованием аппарата Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences). Биотинилированные пептиды иммобилизовывали на чипах SA в соответствии с рекомендациями производителя. Скорость потока буфера HBS-EP составляла 25 мкл/мин. Образец рекомбинантного В-клеточного рецептора серийно разбавляли буфером HBS-EP в диапазоне от 0,0039 до 2 мкМ и тестировали при стандартном времени ассоциации/диссоциации 300/300 с. Константы диссоциации рассчитывали с использованием программного обеспечения Biacore T200 1.0.

3.5 Эксперименты на эукариотических клетках

3.5.1 Идентификация и реконструкция В-клеточного рецептора клеток лимфомы

Биопсии лимфатических узлов пациентов с ФЛ для экспериментов были предоставлены национальным медицинским исследовательским центром онкологии имени Н.Н. Петрова (Санкт-Петербург, Россия). Сразу после операции биоптат разделяли на четыре равных среза, два из которых загружали в реагент RNeasy Lysis Buffer (QIAGEN), а остальные подвергали криоконсервации. Количество клеток лимфомы и экспрессию поверхностного Ig определяли с помощью проточной цитометрии. Из суспензии клеток брали по 250 тыс. клеток на окрашивание моноклональными антителами:

- 1) изотипический контроль – настройка компенсации (пробы, где клетки окрашиваются каждым флуорохромом отдельно при использовании нескольких флуорохромов);
- 2) CD45-FITC, CD20-PE, CD3-PC5 и CD19-PE/Cy7;
- 3) IgG-PE/Cy5, IgM-FITC и CD19-PE/Cy7;
- 4) каппа-FITC, λ -PE и CD19-PE/Cy7.

Образцы биопсии, обработанные RNeasy Lysis Buffer, использовали для выделения общей мРНК с использованием набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Тотальную комплементарную ДНК синтезировали путем обратной транскрипции с использованием набора QuantiTect (QIAGEN). Гены переменных областей тяжелых и легких цепей Ig амплифицировали отдельно друг от друга. ПЦР проводили с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Q5 (New England Biolabs (NEB)) с набором прямых праймеров для переменных генов (V), специфичных для семейства, и обратного праймера, специфичного для константной части генов (C) (Таблица 5). Продукты первого ПЦР подвергали гетеродуплексному анализу в полиакриламидном геле, чтобы отличить

гомодуплексы (моноклональные продукты ПЦР) от размазанных, медленно движущихся гетеродуплексов (полученных из поликлональных лимфоцитов). Фрагменты ДНК ожидаемого размера выделяли из геля. Проксимальный специфический для гена С обратный праймер использовали для второй стадии амплификации и секвенирования. Идентифицированные переменные фрагменты В-клеточного рецептора были клонированы в виде scFv в лентивирусный вектор pLV2-Fc-MTA, кодирующий Fc-фрагмент, прикрепленный к мембране (Рисунок 13Б и 13В). Этими вирусами трансдуцировали клетки Jurkat и Raji. Трансдуцированные Jurkat-ФЛ и Raji-ФЛ анализировали и отбирали клетки с реконструированным В-клеточным рецептором.

Таблица 5 – Панель специфических праймеров для амплификации генов, кодирующих переменные области тяжелых (VH) и легких цепей (каппа (k), лямбда (L)) иммуноглобулинов

Название	Последовательность
VH1aSal	TAATGCTCTAGA CAGGTCAGCTGGTGCAGTCTGG
VH1bSAL	TAATGCTCTAGA CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGG
VH1cSAL	TAATGCTCTAGA SAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGG
VH1dSAL	TAATGCTCTAGA CARATGCAGCTGGTGCAGTCTGG
VH2aSAL	TAATGCTCTAGA CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGG
VH2bSAL	TAATGCTCTAGA CAGGTCACCTTGARGGAGTCTGG
VH3aSAL	TAATGCTCTAGA GARGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
VH3bSAL	TAATGCTCTAGA CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
VH3cSAL	TAATGCTCTAGA GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGG
VH3dSAL	TAATGCTCTAGA GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
VH4aSAL	TAATGCTCTAGA CAGSTGCAGCTGCAGGAGTCSGG
VH4bSAL	TAATGCTCTAGA CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGG
VH5aSAL	TAATGCTCTAGA GARGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
VH6aSAL	TAATGCTCTAGA CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG

VH7aSAL	<u>TAATGCTCTAGA</u> CAGGTSCAGCTGGTGCAATCTGG
JH1-2Bss	<u>TAATCCCAAGCTT</u> GCTGAGGAGACRGTGACCAGGGTGCC
JH3Bss	<u>TAATCCCAAGCTT</u> GCTGARGAGACGGTGACCATTGTCCC
JH4-5Bss	<u>TAATCCCAAGCTT</u> GCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC
JH6Bss	<u>TAATCCCAAGCTT</u> GCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC
Vk1aXba	<u>TAACGCGTCGACC</u> RACATCCAGATGACCCAGTCTCC
Vk1bXba	<u>TAACGCGTCGACC</u> GMCATCCAGTTGACCCAGTCTCC
Vk1cXba	<u>TAACGCGTCGACC</u> GCCATCCRGATGACCCAGTCTCC
Vk1dXba	<u>TAACGCGTCGACC</u> GTCATCTGGATGACCCAGTCTCC
Vk2aXba	<u>TAACGCGTCGACC</u> GATATTGTGATGACCCAGACTCC
Vk2bXba	<u>TAACGCGTCGACC</u> GATRRTGTGATGACTCAGTCTCC
Vk3aXba	<u>TAACGCGTCGACC</u> GAAATTGTGTTGACRCAGTCTCC
Vk3bXba	<u>TAACGCGTCGACC</u> GAAATAGTGATGACGCAGTCTCC
Vk3cXba	<u>TAACGCGTCGACC</u> GAAATTGTAATGACACAGTCTCC
Vk4aXba	<u>TAACGCGTCGACC</u> GACATCGTGATGACCCAGTCTCC
Vk5aXba	<u>TAACGCGTCGACC</u> GAAACGACACTCACGCAGTCTCC
Vk6aXba	<u>TAACGCGTCGACC</u> GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC
Vk6bXba	<u>TAACGCGTCGACC</u> GATGTTGTGATGACACAGTCTCC
VK1-4Hind	<u>TAACTTGGCGCGCC</u> ACGTTTGATHHTCCASYTTGGTCCC
VK5Hind	<u>TAACTTGGCGCGCC</u> ACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCC
VL1aXba	<u>TAACGCGTCGACC</u> CAGTCTGTGCTGACTCAGCCRCC
VL1bXba	<u>TAACGCGTCGACC</u> CAGTCTGTGYTGACGCAGCCRCC
VL1cXba	<u>TAACGCGTCGACC</u> CAGTCTGTCGTGACGCAGCCRCC
VL2Xba	<u>TAACGCGTCGACC</u> CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTSS
VL3aXba	<u>TAACGCGTCGACC</u> TCCTATGWGCTGACTCAGCCACC
VL3bXba	<u>TAACGCGTCGACC</u> TCCTATGAGCTGACACAGCYACC

VL3cXba	TAACGCGTCGACCTCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC
VL3dXba	TAACGCGTCGACCTCCTATGAGCTGATGCAGCCACC
VL4aXba	TAACGCGTCGACCCAGCYTGTGCTGACTCAATCRYC
VL4bXba	TAACGCGTCGACCCCTGCCTGTGCTGACTCAGCCCCC
VL5Xba	TAACGCGTCGACCCAGSCTGTGCTGACTCAGCCRBC
VL6Xba	TAACGCGTCGACCAATTTTATGCTGACTCAGCCCCAC
VL7Xba	TAACGCGTCGACCCAGRCTGTGGTGACTCAGGAGCC
VL8Xba	TAACGCGTCGACCCAGACTGTGGTGACCCAGGAGCC
VL4/9Xba	TAACGCGTCGACCCWGCCTGTGCTGACTCAGCCACC
VL10Xba	TAACGCGTCGACCCAGGCAGGGCTGACTCAGCCACC
VL1Hind	TAACTTGCGCGCCACCTAGGACGGTGACCTTGGTCCC
VL2-3Hind	TAACTTGCGCGCCACCTAGGACGGTCAGCTTGGTCCC
VL7Hind	TAACTTGCGCGCCACCGAGGACGGTCAGCTGGGTCCC

3.5.2 Выделение Т-клеток из цельной крови и их активация

Из медицинской лаборатории ИНВИТРО (Москва, Россия) была получена цельная кровь от здоровых доноров. Венозную кровь собирали в пробирки с ЭДТА с целью связывания Ca^{2+} , необходимого для нормального свертывания. В пробирке, объемом 50 см³, на 15 мл фикола (предварительно нагретого до температуры +37°C в сухой бане) осторожно, избегая смешивания, наслаивали цельную кровь. Центрифугировали в Centrifuge 5804R (Eppendorf, Германия) 30 мин на скорости 650 g. Т-лимфоциты (и другие мононуклеарные клетки) оказывались между низкоплотной плазмой и высокоплотным фиколом в виде кольца. Кольцо мононуклеаров собирали пипеткой, затем разбавляли теплым PBS и снова центрифугировали 5 мин на скорости 350 g при комнатной температуре. Выделение Т-клеток осуществлялось с помощью набора Dynabeads™ Untouched™ Human T Cells Kit согласно протоколу производителя.

Выделенные Т-лимфоциты помещали в среду RPMI 1640 с 10% FBS и IL-2 в концентрации 200 МЕ/мл на флакон площадью 25 см². Активация выделенных клеток производилась с помощью набора Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 согласно инструкции.

После активации Т-лимфоциты культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением FBS до 10%, 100 мкг/мл антибиотик-антимикотика, 2 мМ GlutaMAX и IL-2 в концентрации 200 МЕ/мл при температуре +37°C с 5% CO₂ в инкубаторе Sanyo MCO-80AIC (Panasonic, Япония). При достижении клетками плотности 1 – 3 млн кл./мл, клетки разбавляли в свежей среде до плотности 0,5 млн кл./мл.

3.5.3 Культивирование эукариотических клеток

3.5.3.1 Адгезионные эукариотические клетки

Для получения вирусов и проверки сконструированных плазмид использовали адгезионную клеточную линию из эмбриональной почки человека HEK293T (Clontech, США). В качестве клеток-мишеней с гиперэкспрессией HER2 использовали адгезионную линию аденокарциномы протока молочной железы BT474 (HTB-2) (ATCC, США) и MCF-7 (HTB-22; ATCC), с нормальной экспрессией HER2 клетки линии аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 (HTB-26; ATCC), и в качестве отрицательного контроля использовали клетки яичника китайского хомячка – CHO (Институт Цитологии РАН, Россия). Эти клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10% FBS, 100 мкг/мл антибиотик-антимикотика (Gibco) и 2 мМ GlutaMAX (Gibco). Клетки инкубировали во влажной атмосфере с 5% CO₂ при температуре +37°C. При достижении клетками конfluenceности 75 – 85% клетки пересевали. Пересев адгезионных клеток или их снятие для дальнейшего окрашивания осуществляли следующим образом. Из флакона, в котором росли клетки, удалялась среда, после чего клетки промывали раствором PBS. Затем они обрабатывались 0.05% Trypsin-

EDTA («Gibco», Великобритания) в минимально необходимом количестве для открепления от подложки и инкубировались при температуре +37°C в течение 3 – 5 мин. Далее открепившиеся клетки смывали свежей средой DMEM. Затем необходимое количество полученной суспензии клеток переносили в новый флакон со свежей средой.

3.5.3.2 Суспензионные эукариотические клетки

Клетки Jurkat Т-клеточного лейкоза из коллекции культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия), клетки Jurkat (TIB-152) NFAT Lucia™ (Invivogen, США), линию незрелых В-лимфоцитов человека острого лимфобластного лейкоза – Nalm-6 (Институт Цитологии РАН, Россия) и лимфобластоподобные клетки Raji (CCL-86) из лимфомы Беркитта (Институт Цитологии РАН, Россия), культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% FBS, 100 мкг/мл антибиотик-антимикотика и 2 мМ GlutaMAX. При достижении клетками плотности 2 – 3 млн кл./мл, клетки пересевали.

Контаминация микоплазмой была исключена благодаря регулярному тестированию культур с помощью набора MycoReport Mycoplasma Detection Kit (Евроген, Россия).

Жизнеспособность клеток рассчитывалась по методу исключения трипанового синего на счетчике TC20 (Bio-Rad).

3.5.4 Разморозка клеток

Пробирку с замороженной культурой клеток из криохранилища погружали в термоститрующую баню до полного оттаивания образца и быстро переносили в центрифужную пробирку. Далее культуру центрифугировали в течение 5 мин на скорости 350 g. Удаляли супернатант и клеточную культуру, ресуспендировали в свежей среде. После разморозки для полного выхода из замороженного

состояния и приобретения нормальных показателей роста клеточная культура проходила 2 – 3 клеточных пассажа.

3.5.5 Получение модифицированных клеток

3.5.5.1 Получение лентивирусных частиц

Вирусы нарабатывались в клеточной линии НЕК293Т следующим способом. За день до трансфекции клетки рассеивали в плотности 0,6 – 0,8 млн кл./мл. На следующий день, когда клетки достигали конfluenceности 70 – 80%, проводили непосредственно трансфекцию. Трансфекционную смесь готовили согласно таблице 6. Готовили две смеси с OPTIMEM. В одной с полиэтиленимином, в другой с плазмидами. Упаковочные плазмиды добавляли относительно целевой плазмиды: для pCMV-VSV-G – в соотношении 1:5; для pRRE (GAG) – в соотношении 1:1; для pRSV-Rev – в соотношении 1:2. Смеси инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Затем объединяли растворы и снова инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Далее смесь осторожно добавляли к клеткам (заранее сменив им среду DMEM на свежую). Через 6 – 12 ч снова меняли среду на свежую. Сбор вирусов происходил через 48 – 72 ч. Супернатант центрифугировали два раза при 300g и 2000g в Centrifuge 5804R (Eppendorf, Германия), затем фильтровали через 0,4 мкм поливинилиденфторидный фильтр (PVDF) (GE, США). Готовый лентивирусный супернатант хранили при температуре +4°C (если он был необходим в ближайшее время) или замораживали в жидком азоте и хранили при температуре –80°C в морозильнике MDF-U5386S (Panasonic, Япония). Титр лентивирусных частиц определяли с помощью иммуноферментного анализа Lenti-X p24 (ИФА; Clontech).

Таблица 6 – Количество плазмид, среды и PEI для трансфекции в зависимости от размера пластика для культивирования

	Планшет, количество лунок	Флакон, см ²
--	------------------------------	-------------------------

Пластик для культивирования	48	24	12	6	T25	T75	T150
Объем пробирки со средой, мл	0,25	0,5	1	2	5	12	25
плазмидный вектор библиотеки, мкг	0,25	0,5	1	2	5	15	30
Упаковочная плазида GAG, мкг	0,25	0,5	1	2	5	15	30
Упаковочная плазида Rev, мкг	0,125	0,25	0,5	1	2,5	7,5	15
Плазида оболочки (VSV-g), мкг	0,05	0,1	0,2	0,4	1	3	10
Полиэтиленимин (PEI), мкл	1	2	4	8	25	75	150
ОПТИМЕМ, мкл	50	50	100	200	500	1500	3000

3.5.5.2 Лентивирусная трансдукция

Для получения модифицированных клеток использовали лентивирусную трансдукцию. Суспензионные клетки ресуспендировали при плотности 1×10^6 кл. в 1 мл свежей среды и 1 мл лентивирусного супернатанта с добавлением 5 мкг/мл полибрена. Суспензии центрифугировали на скорости 1200 g в течение 90 мин при температуре $+32^\circ\text{C}$ и инкубировали еще 8 – 12 ч в инкубаторе. Адгезионные линии клеток рассеивали за сутки до трансдукции в 6-луночный планшет, чтобы на момент добавления вирусов конfluence составляла не менее 80%. На следующий день старую среду отбирали, затем в планшет добавляли 1 мл свежей среды и 1 мл лентивирусного супернатанта с добавлением 5 мкг/мл полибрена и снова помещали в инкубатор на 8 – 12 ч. После чего среда заменялась на свежую.

3.5.5.3 Получение линий клеток экспрессирующих люциферазу

Для получения клеток со стабильной экспрессией люциферазы был использован плазмидный вектор pCDH-CMV-LUC-EF1 Hygro (#129437, addgene) с геном устойчивости к Гигромицину В под вторым промотором. После лентивирусной трансдукции клетки были селектированы по антибиотику. Далее, анализировали активность люциферазы в полученных клетках. Для этого брали 5000 клеток, разбавляли в 100 мкл PBS, переносили в 96-луночный планшет и добавляли D-люциферин (GoldBio) в концентрации 150 мкг/мл. Инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 5 мин. Оценку люминесценции

проводили на приборе Varioskan LUX (ThermoScientific, США) или IVIS Spectrum In vivo (PerkinElmer).

3.5.6 Цитофлуориметрия и сортировка клеток

Суспензию клеток переносили в центрифужную пробирку на 1,7 мл. Адгезионные клетки предварительно открепляли трипсином и ресуспендировали в свежей питательной среде. Клетки осаждали центрифугированием в настольной центрифуге Eppendorf 5415D при ускорении 1200g в течение 5 мин, после чего супернатант удаляли. Клетки отмывали от остатков среды раствором PBS, а одно окрашивание отбиралась аликвота 100 мкл клеточной суспензии с концентрацией 0,5–5 млн клеток в 1 мл. К клеткам добавляли флуоресцентно-меченные антитела, согласно рекомендациям производителя, и их инкубировали во льду в течение 1 ч.

После промывания осажденные клетки ресуспендировали в 150 мкл PBS для анализа методом проточной цитофлуориметрии на цитофлуориметре NovoCyte 2060 или Acea NovoCyte 3000 (ACEA Biosciences, США) и/или сортировали клетки на сортере SH800S («Sony») или FACSAria III (BD Biosciences). В ходе анализа оценивалась доля окрасившихся клеток относительно общего числа живых клеток.

В исследованиях использовали следующие антитела: анти CD3 человека FITC (BioLegend), анти CD8 человека PE (BioLegend), анти CCR7 человека PE (BioLegend), анти CD45RA человека FITC (BioLegend), анти CD69 человека Alexa Fluor 488 (BioLegend) и античеловеческий B220 APC (антигенпрезентирующие клетки; BioLegend). Экспрессию химерного ФЛ-BCR детектировали с использованием антител анти IgG1 человека PE (SouthernBiotech) или синтетических биотинилированных циклопептидов (GeneCust) и стрептавидина, конъюгированного с FITC или PE (Thermo Fisher Scientific). Молекулы CAR детектировали с использованием поликлональных антител козы конъюгированных с DyLight 650 специфичных к IgG человека (Thermo Fisher

Scientific). анти-CD19 CAR (клон FMC63) выявляли с использованием биотинилированного белка L (Thermo Fisher Scientific) и стрептавидина, конъюгированного с FITC (Thermo Fisher Scientific).

Для окрашивания BsCAR T-клеток использовали барназу, 9.29-барназу и G3-барназу, конъюгированные с FITC, в конечной концентрации 1 мкг/мл.

Для анализа проникающих в опухоль BsCAR T-клеток опухоли протирали через нейлоновый сетчатый фильтр с размером ячеек 40 мкм, промывали холодным PBS. Полученную суспензию клеток обрабатывали АСК буфером (Ammonium-Chloride-Potassium buffer) для лизиса эритроцитов. Для обнаружения BsCAR полученные одиночные клетки окрашивали анти-IgG4 Goat Anti-Human, DyLight™ 650 (SA510137, Invitrogen) и меченой FITC барназой (барназа-FITC) и анализировали с помощью проточной цитофлуорометрии. Канал BL1 для FITC меченых белков (возбуждающий лазер 488 нм, эмиссионный фильтр 530/30 нм) и BL3 для DyLight™ 650 меченых антител (возбуждающий лазер 635 нм, эмиссионный фильтр 660/20 нм).

Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения NovoExpress (ACEA Biosciences) и FlowJo X10 (FlowJo).

3.5.7 Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Клетки инкубировали с 2 мкг/мл белков и Hoechst 33342 (1 мкг/мл) в PBS с 1% BSA на льду в течение 30 мин. Затем их отмывали от несвязавшихся белков и визуализировали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с использованием конфокального микроскопа LSM 980 (Zeiss) при следующих условиях: возбуждение 488 нм, эмиссия 492-550 нм для обнаружения FITC и возбуждение 405 нм, эмиссия 410-520 нм для обнаружения Hoechst33342.

3.5.8 Анализ активации Т клеток с помощью репортерных клеток Jurkat NFAT-Luc

Репортерная линия клеток Jurkat NFAT-Luc (Invivogen) содержит ген люциферазы под контролем NFAT промотора. При активации, клетки Jurkat NFAT-Luc продуцируют люциферазу. Активность люциферазы в супернатанте коррелирует со степенью активации Т клеток. Для детекции люциферазной активности был использован реагент QUANTI-Luc («InvivoGen», США). Коинкубация Jurkat NFAT-Luc с клетками-мишенями проводилась в 96-луночном планшете. 2×10^4 клеток Jurkat NFAT-Luc с PD-1 блокатором смешивали в соотношении 2:1 с Nalm-6 клетками. 100 тыс. клеток Jurkat NFAT-Luc, модифицированные BsCAR, добавляли к прикрепленным 10 тыс. клеток BT474, и затем добавляли к клеткам дарпин-барназу. В качестве отрицательного контроля использовали нетрансдуцированные Jurkat NFAT-Luc. В качестве положительного контроля к клеткам Jurkat NFAT-Luc добавляли PMA (форбол-миристан-ацетат) в конечной концентрации 10 нг/мл. Клетки совместно инкубировали 24 ч. Затем отбирали супернатант и переносили на непрозрачный 96-луночный планшет с добавлением субстрата QUANTI-Luc™ substrate (Invivogen, Франция). Оценку люминесценции проводили на приборе Varioskan LUX (ThermoScientific, США). Значение IC₅₀ определяли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

3.5.9 Цитотоксический анализ

3.5.9.1 Цитотоксический анализ молекул-посредников с использованием резазурина

Цитотоксичность молекул-посредников тестировали с использованием анализа на основе резазурина. Клетки высевали на 96-луночный планшет по 5×10^3 клеток на лунку в 100 мкл среды DMEM с добавлением 10% FBS и культивировали в течение 10 ч. Молекулы-посредники добавляли в лунки с

клетками в 100 мкл питательной среды DMEM и инкубировали в течение 10 сут. Затем среду удаляли и к клеткам добавляли 100 мкл раствора резазурина (0,13 г/л в PBS). Образцы инкубировали в течение 3 ч при температуре +37°C и измеряли оптическую плотность в каждой лунке с помощью микропланшетного-ридера Infinite 1000 Pro (Tecan, Австрия) при длине волны возбуждения $\lambda = 530$ нм и эмиссии $\lambda = 590$ нм. Значение IC₅₀ определяли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

3.5.9.2 Цитотоксический анализ CAR T-клеток

Для подтверждения цитотоксической активности и специфичности модифицированных Т-лимфоцитов использовали набор CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, США), согласно рекомендациям производителя. Метод основан на анализе ферментативной активности внутриклеточной лактат-дегидрогеназа (ЛДГ) из лизированных клеток. Оценочную спектроскопию проводили на приборе Varioskan LUX. Все эксперименты выполнялись в трехкратной повторности.

Для изучения аутокринноотобранных CAR-T мок-трансдуцированные Т-клетки (контроль), CD19-CAR-T, ФЛ1-CAR-T, ФЛ2-CAR-T, ФЛ3-CAR-T или Мус-CAR-T совместно инкубировали в течение 6 ч вместе с 10⁴ Raji-ФЛ1, Raji-ФЛ2, Raji-ФЛ3 или клетками из биопсии пациента в полной среде RPMI 1640 с добавлением человеческого ИЛ-2 (40 ЕД/мл). В качестве отрицательного контроля использовали клетки Raji или клетки, выделенные из биопсии лимфатического узла другого пациента.

Для изучения модульных CAR-T на основе барназы-барстара в ходе эксперимента клетки BT474, экспрессирующие HER2, рассеивали в 96-луночной планшете в количестве 5000 клеток на лунку. Через 4 ч (время, необходимое для прикрепления клеток к подложке) добавляли активированные BsCAR Т-лимфоциты вместе с дарпин-барназой и ИЛ-2 (40 ЕД/мл). Дарпин-

барназу титровали от 10 до 0,016 нМ, а в случае титрования клеток-эффекторов к клеткам-мишеням – 1 нМ. После этого клетки совместно инкубировались 16 ч. Чтобы оценить базальные уровни цитотоксичности BsCAR-T и Mock T-клеток, T-клетки инкубировали в отсутствие дарпин-барназы. Максимальный лизис клеток определяли по лизису клеток-мишеней с использованием 10 мкл раствора для лизиса клеток из набора. Значение IC₅₀ определяли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

3.5.10 Анализ секреции цитокинов CAR-T клетками

Для анализа секреции цитокинов 5×10^3 клеток BT-474 смешивали с 5×10^4 клеток Mock-T или BsCAR-T в 96-луночной планшете в течение 24 ч в присутствии различных концентраций дарпин-барназы в RPMI без ИЛ-2. Базальные уровни ИФН- γ и ИЛ-2 были обнаружены в нестимулированных образцах CAR-T. Супернатант отделяли от клеток центрифугированием (+4°C, 300g, 5 мин), переносили в новый 96-луночный планшет и хранили при температуре -20°C. Секрецию ИЛ-2 и ИФН- γ CAR T-клетками человека анализировали с помощью наборов цитокин-специфического ИФА (Вектор-бест, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Значения IC₅₀ определяли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

3.5.11 Получение антител

Для получения растворимой формы ФЛ BCR в виде полноразмерного антитела переменные цепи легкой и тяжелой цепи были клонированы в вектор pFUSE (InvivoGen) и продуцированы с помощью системы экспрессии FreeStyle 293 (Thermo Fisher Scientific). Для трансфекции на 1 мл клеток концентрацией 1 млн/мл брали 2 мкл полиэтиленимина с концентрацией 1 мг/мл (PEI 25 кДа, Sigma-Aldrich) и по 0,5 мкг pFUSE с тяжелой и легкой цепью. После 4 – 6 дней

наработки, когда жизнеспособность клеток падала ниже 70%, клеточная культура центрифугировалась и фильтровалась (0,22 мкм). Супернатант отбирался для очистки на колонке с белком G (Protein G сефароза, Thermo Fisher). Анализ содержания антитела в каждой из фракции проводился на приборе Nanodrop. Далее чистота антител проверялась с помощью электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле с использованием приборов Bio-Rad. Используя раствор Кумасси, проявлялся гель и анализировался на приборе VersaDoc (Bio-Rad, США).

3.6 Эксперименты на мышах

3.6.1 Модель *in vivo*

Все процедуры с животными проводились в строгом соответствии с рекомендациями по надлежащему использованию и уходу за лабораторными животными. Проводимые действия были одобрены Институтом по уходу и использованию животных ИБХ РАН для экспериментов на базе ИБХ РАН и Межинститутской комиссией по биоэтике Сибирского отделения Российской академии наук (СО РАН) для экспериментов в Центре генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН. Животных содержали в безпатогенных условиях в Пущинском животноводческом комплексе ИБХ РАН и в виварии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Для экспериментов с BsCAR были взяты мыши-самцы NSG (NOD/SCID/IL2 γ null) 6-8 недель, предоставленные питомником лабораторных животных города Пущино Московской области (коллекция лабораторных грызунов категории СПФ для фундаментальных, медико-биологических и фармакологических исследований, Россия). Мышам, весом 16-20 грамм, подкожно инокулировали 2×10^6 ВТ-FLuc клеток в 30% матригеле в 100 мкл полной культуральной среды. Как только опухоль достигала пальпируемого

объема рандомизировали и делили на группы по 6 особей. Животным из всех групп внутривенно вводили 10×10^6 BsCAR T-клеток. Через 4 ч после инъекции BsCAR T-клеток мышам начинали вводить 9.29-барназу и G3-барназу. Дозы дарпин-барназы увеличивали в соответствии с установленным протоколом (5, 50 и 500 нмоль/кг соответственно). Далее делали перерыв в 7 – 8 дней, и затем цикл повторяли два раза. Динамику роста опухоли определяли каждые 10 дней с использованием системы визуализации IVIS Spectrum In vivo (PerkinElmer) после внутрибрюшинной инъекции D-люциферина (GoldBio). Дополнительно, объем опухоли измеряли штангенциркулем и оценивали по эллипсоидальной формуле: $V = \frac{1}{2}$ (длина \times ширина²).

Для экспериментов на базе института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН использовали мышей-самок NOD SCID (CB17-Prkdc^{scid}/NcrCtrl) в возрасте от шести до восьми недель со средним весом от 16 до 20 г. Опухоли прививали путем инокуляции 5×10^6 клеток Raji-ФЛ1 (реконструированный B-клеточный рецептор фолликулярной лимфомы пациента) в 200 мкл 0,9% солевого раствора подкожно в левый бок животного. Для эксперимента по контролю монотерапии модульной системы, мышам подкожно инокулировали 2×10^6 BT-FLuc HER2 сверхэкспрессирующих раковых клеток в 30% матригеле в 100 мкл полной культуральной среды. Как только опухоль достигала пальпируемого объема не менее 50 мм³, животных случайным образом распределяли в экспериментальные и контрольные группы. Мышам с опухолями Raji внутривенно вводили 3×10^6 ФЛ1-CAR-T, CD19-CAR-T или Muc-CAR-T на 17-й день после инокуляции опухоли. Объем опухоли измеряли штангенциркулем и оценивали по эллипсоидальной формуле: $V = \frac{1}{2}$ (длина \times ширина²). Опухоли контролировали с использованием системы визуализации In-Vivo MS FX PRO (Carestream) после внутрибрюшинной инъекции D-люциферина (GoldBio). Животных подвергали эвтаназии, когда объем опухоли достигал 2 см³. На 38-й день после прививки Raji опухоли (21-й день после введения CAR-T) за 10 мин до эвтаназии мышам вводили 150 мкл (4,29 мг на каждую особь)

свежезамороженного водного раствора D-люциферина (GoldBio) и собирали головной мозг, легкие, сердце, печень, селезенку, почки и опухоли. Каждый орган промывали PBS и визуализировали интенсивность биолюминесценции с использованием системы визуализации In-Vivo MS FX PRO (Carestream). У животных каждой экспериментальной группы также выделяли клетки крови, селезенки и костного мозга. Эритроциты лизировали буфером для лизиса эритроцитов (0,15 М NH_4Cl , 10 мМ NaHCO_3 и 0,1 мМ ЭДТА). Клетки окрашивали антителами, специфичными к CD3 (для образцов крови), CD45RA и CCR7, и анализировали с помощью проточного цитометра NovoCyte (ACEA Biosciences). Опухоли фиксировали в 4% нейтральном забуференном формальдегиде в течение 2-х недель и подвергали парафиновой срезке по стандартным протоколам.

3.6.2 Гистология и иммуногистохимия

Макроскопический патологоанатомический анализ животных включал: осмотр наружных поверхностей, внешний вид первичных опухолей, состояние грудной клетки, брюшной полости, органов и тканей. Для дальнейшей гистологической оценки образцы опухолей от каждого животного собирали во время вскрытия и фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, обезвоживали в восходящих спиртах и ксилолах, заливали в парафин HISTOMIX (BioVitrum). Парафиновые срезы (5 – 10 мкм) окрашивали гематоксилином и эозином, исследовали под микроскопом. Срезы опухолей для иммуногистохимического исследования (3 – 4 мкм) нарезали на микротоме Microm HM 355S (Thermo Fisher Scientific) и дополнительно депарафинировали и регидратировали; нагревали в микроволновой печи при мощности 700 Вт. Образцы инкубировали со специфическими антителами к CD8 (M3164, Spring Bioscience) в соответствии с протоколом производителя. Затем срезы инкубировали со вторичными HRP-конъюгированными антителами (система

обнаружения Spring Bioscience), подвергали воздействию субстрата DAB (3,3-диаминобензидин) и окрашивали гематоксилином Майера. Изображения получали с помощью микроскопа Axiostar Plus, оснащенного цифровой камерой Axiocam MRc5 (Zeiss, Германия) при 10-, 20- и 40-кратном увеличении. Макроскопическое исследование опухолей включало оценку размеров опухоли, наличия капсулы, некрозов и кровоизлияний. Микроскопическое исследование опухолей включало оценку гистопатологических изменений опухолевой ткани в виде некроза и апоптоза, наличия митозов, инфильтрации CD8-лимфоцитами.

Окрашивание срезов опухолей мышей из эксперимента с модульными CAR-T было произведено флуоресцентными антителами к CD8 (1:300, клон RPA-T8, BioLegend), конъюгированными с PE. Антиген извлекали перед окрашиванием с использованием нагретого до температуры 37°C 10 mM буфера Tris-EDTA (pH 9,0). Для иммуноокрашивания срезы, промытые буфером PBS (pH 7,4), инкубировали в PBS, содержащим 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 0,3 mM глицина и 0,5% Triton X-100, в течение 1 ч и окрашивали с антителом в соответствующем разведении в течение ночи при комнатной температуре. Далее, срезы промывали PBS, содержащим 0,1% Tween, и помещали в среду, содержащую Hoechst 33342. Изображения получали с использованием микроскопа Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1, CFI Plan Apo VC 20×0,75 и Apo TIRF Plan Fluor. 63×1,49 (Nikon Corporation, Япония).

3.7 Методы и способы обработки результатов и проведения статистического анализа

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью пакета программ Prism 9 (GraphPad Software). Данные по активации, цитотоксичности и секреции провоспалительных цитокинов были проанализированы с помощью двухстороннего дисперсионного анализа с поправкой Даннета для множественных сравнений или множественными

сравнениями Сидака и представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Значения p определяли с помощью непарного t -критерия. Статистическая значимость: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$. Данные, полученные *ex vivo* (проточная цитометрия, тест на цитотоксичность), прошли статистическую обработку с использованием t -критерия Стьюдента (двухсторонний, непарный). Измерения объема опухоли были статистически обработаны с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и проанализированы с помощью критерия Манна-Уитни и представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Статистическая значимость: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$. Кривые выживаемости построены с использованием метода Каплана-Мейера, а статистические сравнения были выполнены с помощью критерия логарифмического ранга (Мантела-Кокса). Статистическая значимость: $*p < 0,05$. Процент CD8-позитивных клеток определяли в пяти окрашенных срезах трех биологических повторов в каждой группе и анализировали с помощью одностороннего ANOVA с t -критерием множественного сравнения Тьюки ($n = 3$). Статистическая значимость: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение

4 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

В настоящее время для успешной 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. На сегодняшний день подбор распознающей части CAR против опухолевого антигена для каждого пациента невозможен из-за слишком больших временных затрат. Однако, разработанная нами аутокринная система отбора пептидов, селективных для В-клеточного рецептора, встраиваемых в структуру распознающего домена CAR (схема метода представлена на рисунке 12), позволит приблизить персонализированную терапию к практике [36]. Использование данной системы в клинической практике по времени будет сопоставимо с классической CAR-T терапией.

Краткая схема аутокринного отбора пептидов заключается в следующем. В-клеточный рецептор клонируется и экспрессируется в формате антитела на поверхности репортерных клеток вместе с CAR. CAR каждой репортерной клетки несет в своем составе уникальный лиганд – один из пептидов из библиотеки. Репортерные клетки активируются при взаимодействии пептида в составе CAR с В-клеточным рецептором. Активированные клетки сортируются. Несколько раундов аутокринной селекции позволяют обнаружить специфический пептидный лиганд для В-клеточного рецептора. Последовательность CAR, слитого с отобранным пептидом, встраивается в Т-клетки человека. CAR-T тестируется на

специфическую цитотоксичность. После чего, полученные CAR-T могут использоваться в лечении пациента.

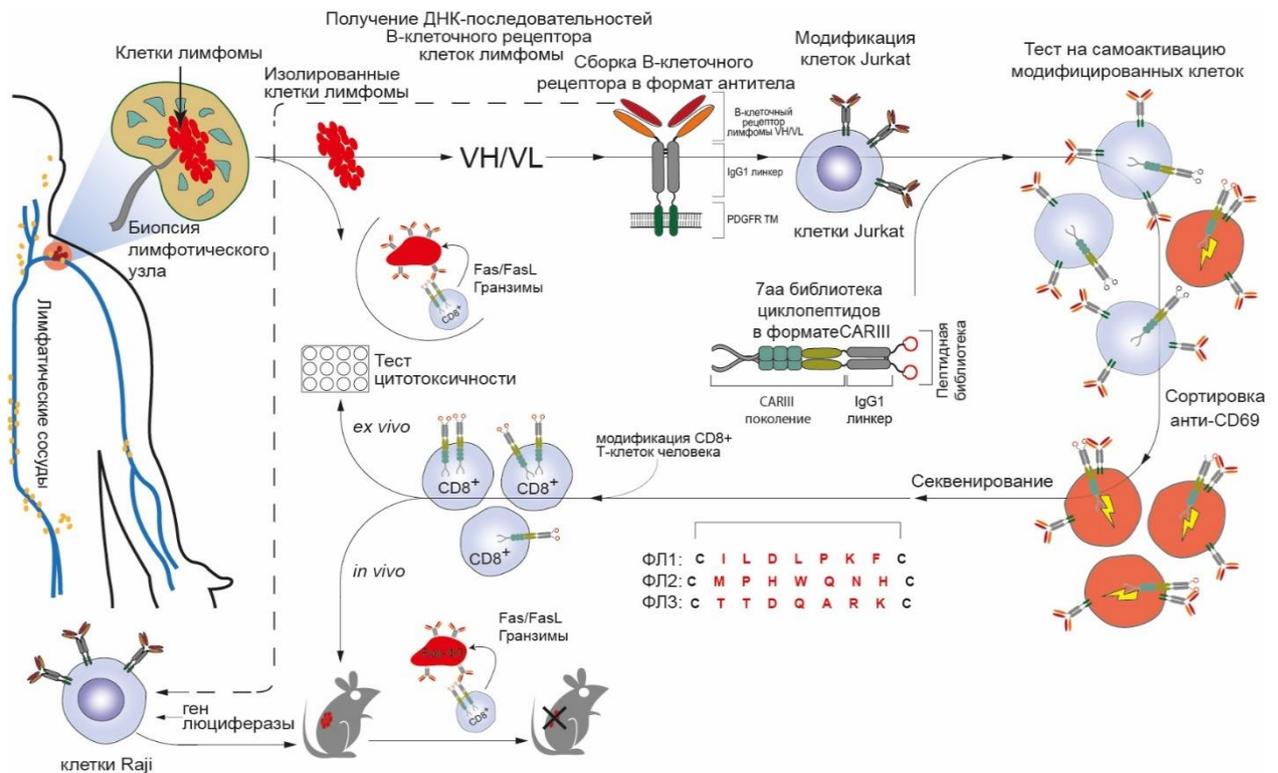


Рисунок 12 – Схематическое изображение аутокринного отбора распознающей части CAR в формате пептида для персонализированной CAR-T терапии. Гены В-клеточных рецепторов из биопсии лимфатического узла от пациента с фолликулярной лимфомой (ФЛ) клонируются в виде мембраносвязанных В-клеточных рецепторов (мембранный 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, модифицированных опухолеспецифическим CAR. Полученные CAR-T тестируются на способность элиминировать опухолевые клетки *ex vivo* на иммунодефицитных мышах или с использованием модельных клеток Raji, которые модифицированы мембраносвязанными В-клеточными рецепторами, в качестве клеток мишеней как *in vitro*, так и *in vivo*. Модельные клетки Raji удобны тем, что их можно дополнительно модифицировать геном люциферазы для прижизненной визуализации в экспериментах *in vivo*. VH – варибельная область тяжелой цепи Ig; VL – варибельная область легкой цепи Ig

4.1.1 Идентификация нуклеотидной последовательности В-клеточного рецептора злокачественных В-клеток

В проведенном исследовании использовали биопсии из лимфатических узлов от трех пациентов с фолликулярной лимфомой (ФЛ) для определения нуклеотидной последовательности В-клеточных рецепторов из злокачественных клеток. Брали центральную часть биоптата опухоли, чтобы снизить число попаданий неопухолевых клеток в образец. При помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с кДНК, полученной в ходе обратной транскрипции тотальной мРНК, амплифицировали 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 [45]. 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 13Б правая сторона и 13А правая сторона, рисунок 12Б и 12В).

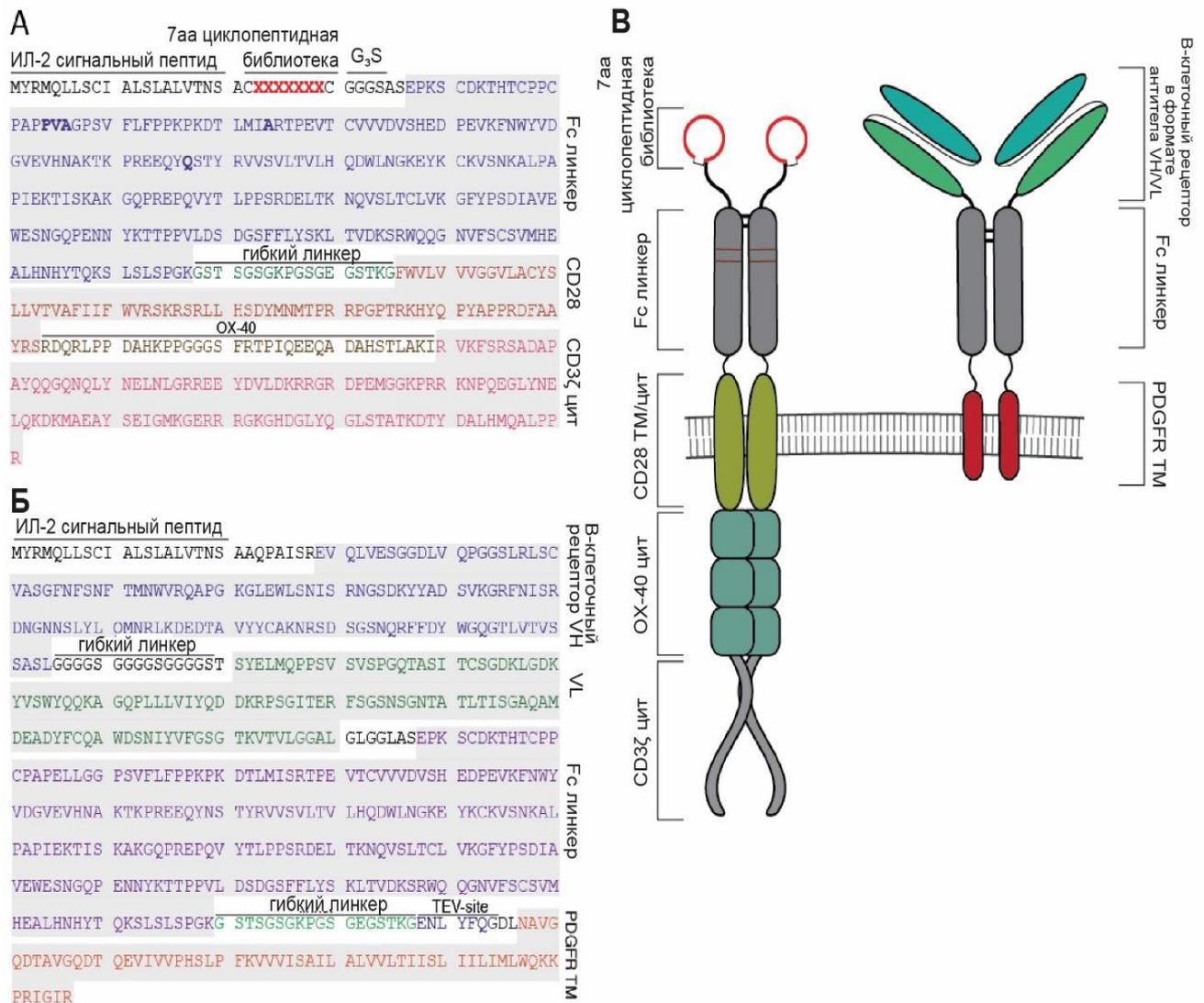


Рисунок 13 – Структура восстановленного В-клеточного рецептора в формате заякоренного в мембране антитела и комбинаторной циклопептидной библиотеки в составе CAR. А) Аминокислотная последовательность CAR с комбинаторной библиотекой циклопептидов. Б) scFv В-клеточного рецептора через Fc IgG1, заякоренный в мембране трансмембранным доменом PDGFR. В) Схематическое изображение молекул, экспрессируемых клеткой Jurkat

4.1.2 Аутокринный отбор специфического пептида для В-клеточного рецептора

В исследовании была использована аутокринная репортерная система для прямого отбора пептидов, специфичных для В-клеточного рецептора злокачественных клеток, слитых с CAR (Рисунок 14). Метод позволяет

осуществлять прямой отбор определенного пептида, который можно использовать для нацеливания CAR-T против опухолевых клеток пациента. 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. После трансдукции модифицированные клетки несут на своей поверхности библиотеку циклопептидов, соединенную с CAR, и восстановленный заякоренный в мембране В-клеточный рецептор (Рисунок 13А). 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) [231], который легко обнаруживается с помощью специфических флуоресцентно-меченых антител.

Предварительно была подтверждена работоспособность репортерной системы на модели, в которой использовали известный с-Мус эпитоп, как пептид в составе CAR, и переменные домены антитела анти Мус (клон 9E10) в качестве образца мембраносвязанного В-клеточного рецептора. Клетки Jurkat, экспрессирующие только связанные с мембраной антитела анти Мус без коэкспрессии Мус-CAR, не показали заметной активации. Тогда как клетки, содержащие как мембраносвязанные антитела анти Мус, так и Мус-CAR, активировались (Рисунок 14Б).

На основании полученных результатов на модельной системе Мус, был выполнен дальнейший аутокринный отбор пептидов в составе CAR уже для В-клеточного рецептора от пациентов с лимфомой. Провели несколько раундов селекции, в результате которых были обнаружены три циклопептида CILDLPKFC (ФЛ1), SMPHWQNHС (ФЛ2) и STTDQARKC (ФЛ3), которые специфичны для

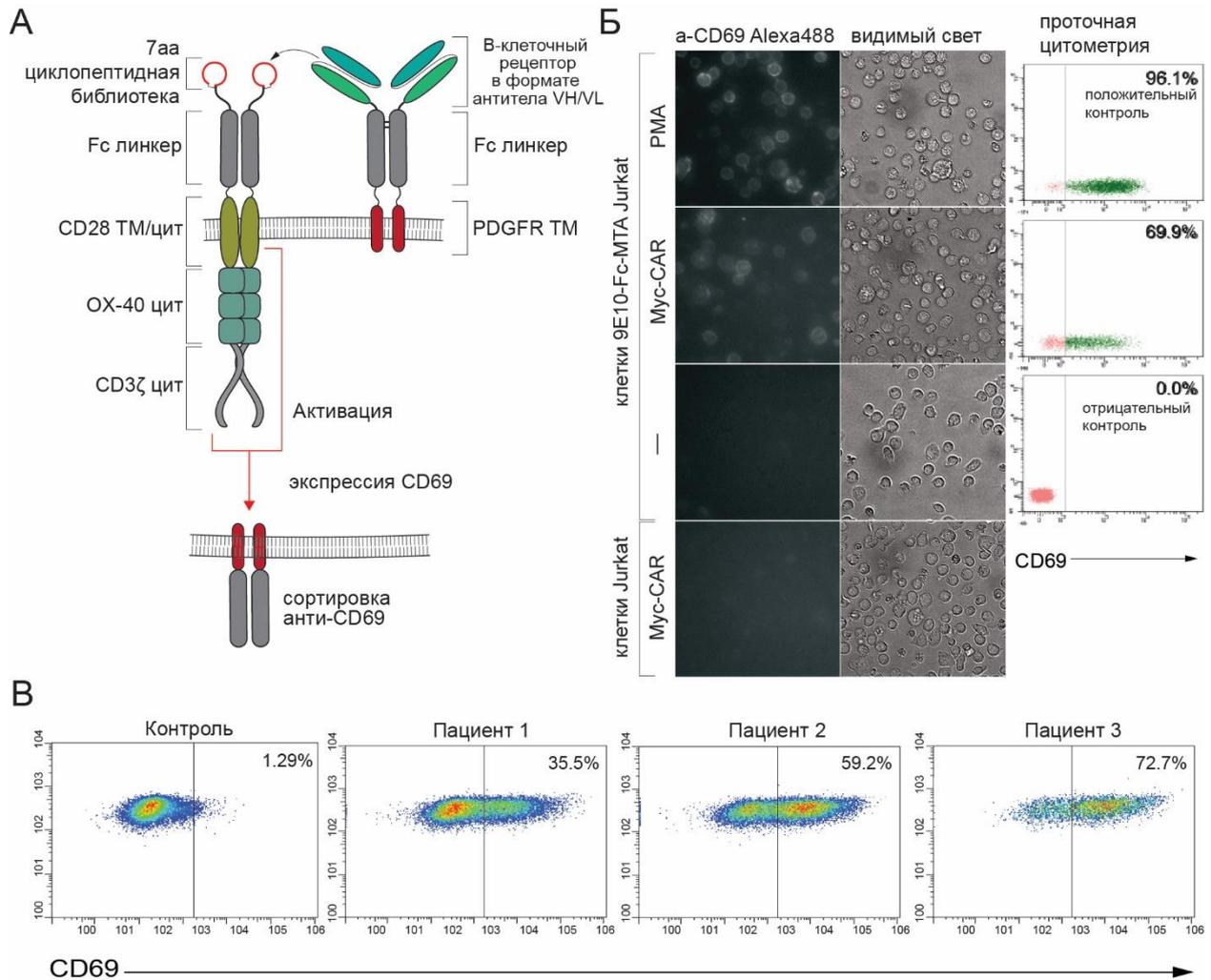


Рисунок 14 – Аутокринный отбор циклопептидов слитых с CAR к В-клеточному рецептору опухолевых клеток. А) Схематическое изображение репортерной системы. PDGFR TM – трансмембранная часть рецептора тромбоцитарного фактора роста. Б) Проверка репортерной системы с помощью взаимодействия пары Мус(пептид)-CAR/антитело анти 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

трех восстановленных в формате scFv В-клеточных рецепторов, полученных от трех пациентов. Специфичность найденных пептидов к растворимой форме В-клеточного рецептора в формате рекомбинантного антитела была доказана ИФА и поверхностным плазмонным резонансом (ППР) (Рисунок 15). Также с помощью флуоресцентной микроскопии было показано, что циклопептид-CAR запускает

активацию только Jurkat с соответствующим В-клеточным рецептором, связанным с мембраной (Рисунок 15).

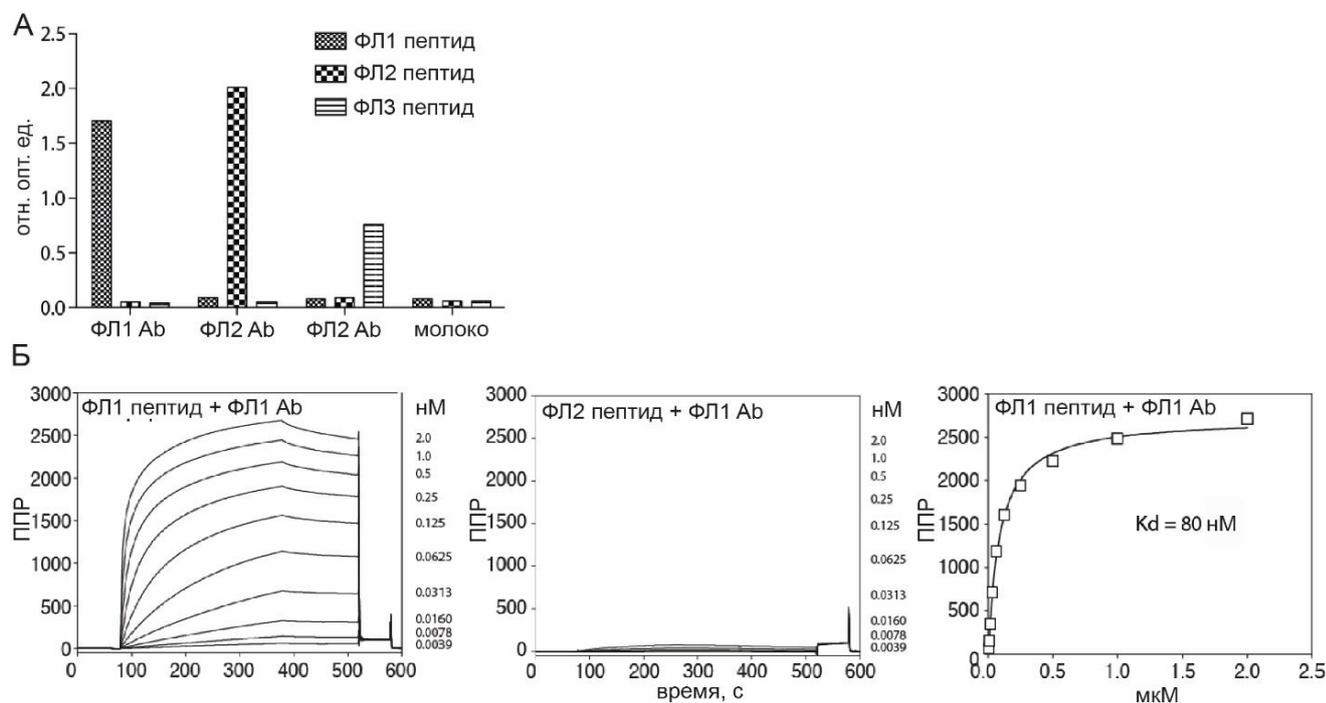


Рисунок 15 – Отобранные пептидные лиганды специфически взаимодействуют со злокачественными В-клеточными рецепторами в формате растворимых антител. А) ИФА взаимодействия выбранных циклопептидов ФЛ1, ФЛ2 и ФЛ3 с В-клеточными рецепторами в формате растворимых рекомбинантных антител ФЛ1 Ab, ФЛ2 Ab и ФЛ3 Ab. Б) ППР-анализ взаимодействия отобранного циклопептида ФЛ1 и злокачественных В-клеточных рецепторов в формате растворимых рекомбинантных антител ФЛ1 Ab и ФЛ3 Ab. Количественные характеристики средства ФЛ1 Ab к идентифицированному пептиду ФЛ1 по данным ППР демонстрируют сильное взаимодействие ($K_d=80$ нМ), в то время как пептид ФЛ2 не имеет сродства к В-клеточному рецептору пациента 1 (ФЛ1 Ab)

4.1.3 Специфическая цитотоксичность CAR-T в отношении клеток лимфомы

На следующем этапе экспериментов была зафиксирована 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

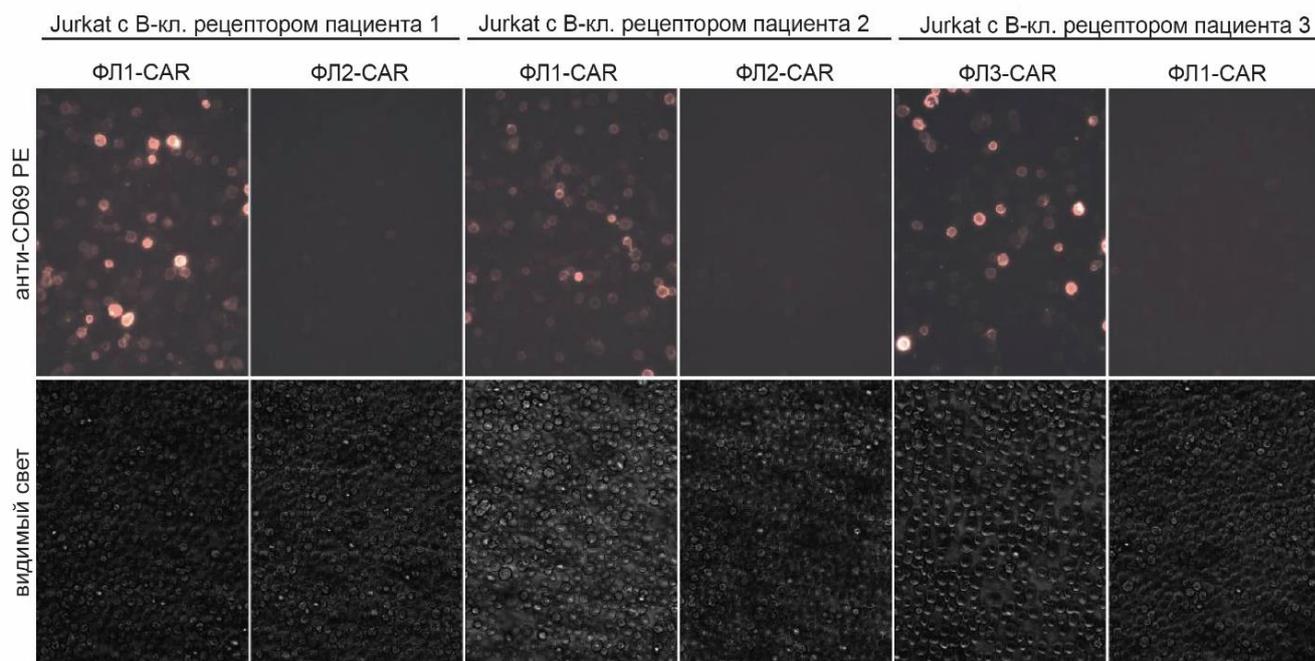


Рисунок 16 – Пептиды, специфичные для В-клеточных рецепторов пациентов, в структуре CAR активируют репортерные клетки Jurkat, трансдуцированные связанными с мембраной В-клеточными рецепторами. Активированные Jurkat окрашиваются антителом анти CD69 (PE)

заякоренного антитела, *in vitro*. На поверхности клеток Raji была подтверждена экспрессия В-клеточного рецептора путем окрашивания антителом анти Fc, а также окрашиванием биотинилированными пептидами ФЛ1, ФЛ2 и ФЛ3 и последующим вторичным окрашиванием пептидов флуоресцентно меченым стрептавидином (FITC) (Рисунок 17А). Для цитотоксического теста смешивали Т-лимфоциты, экспрессирующие ФЛ1-CAR, ФЛ2-CAR, ФЛ3-CAR, а для положительного контроля – анти CD19-CAR, нацеленные на антиген CD19 (FMC63-CAR), 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 17Б). Примечательно, что специфическая цитотоксичность ФЛ1-CAR-Т, ФЛ2-CAR-Т и ФЛ3-CAR-Т была сравнима с CD19-CAR-Т. Мы наблюдали минимальный лизис, не только когда использовали контрольные неспецифичные CAR-Т с

модифицированными клетками Raji, но и в случае инкубации ФЛ1-CAR-T, ФЛ2-CAR-T и ФЛ3-CAR-T с немодифицированными клетками Raji (Рисунок 18).

В результате проведенных экспериментов показано, что аутокринная платформа отбора пептидов к В-клеточному рецептору позволяет создать циклопептид-CAR-T клетки с высоким терапевтическим потенциалом и специфичностью против злокачественных В-лимфоцитов.

Кроме всего прочего, была проведена оценка цитотоксичности *ex vivo* ФЛ1-CAR-T против клеток из исходной биопсии пациента 1. Более 60% клеток в образце биопсии представляют собой В-клетки, специфичные к пептиду ФЛ1 (Рисунок 17В). Клетки из контрольного образца биопсии, полученного от другого пациента с фолликулярной лимфомой (пациент 4), не продемонстрировали какого-либо значительного окрашивания пептидом ФЛ1. Анализ цитотоксичности показал, что ФЛ1-CAR-T специфически лизировали клетки из образца биопсии, в то время как Мус-CAR-T и контрольные Т-клетки не обладали какой-либо противоопухолевой активностью (Рисунок 17Г).

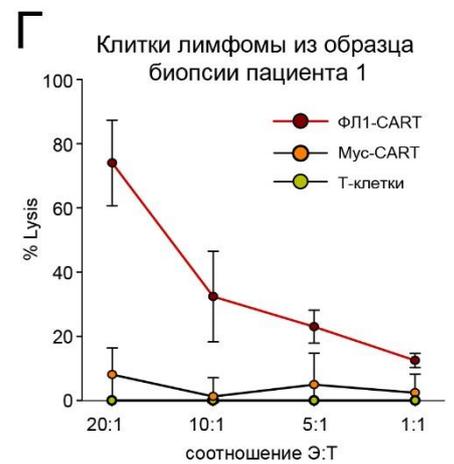
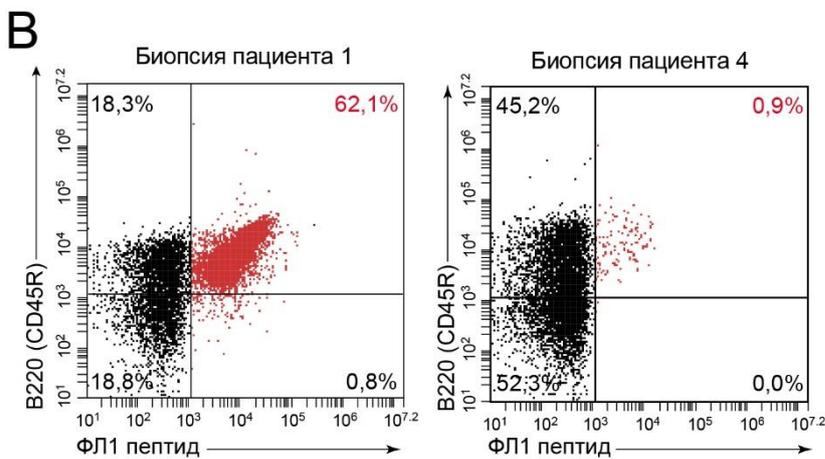
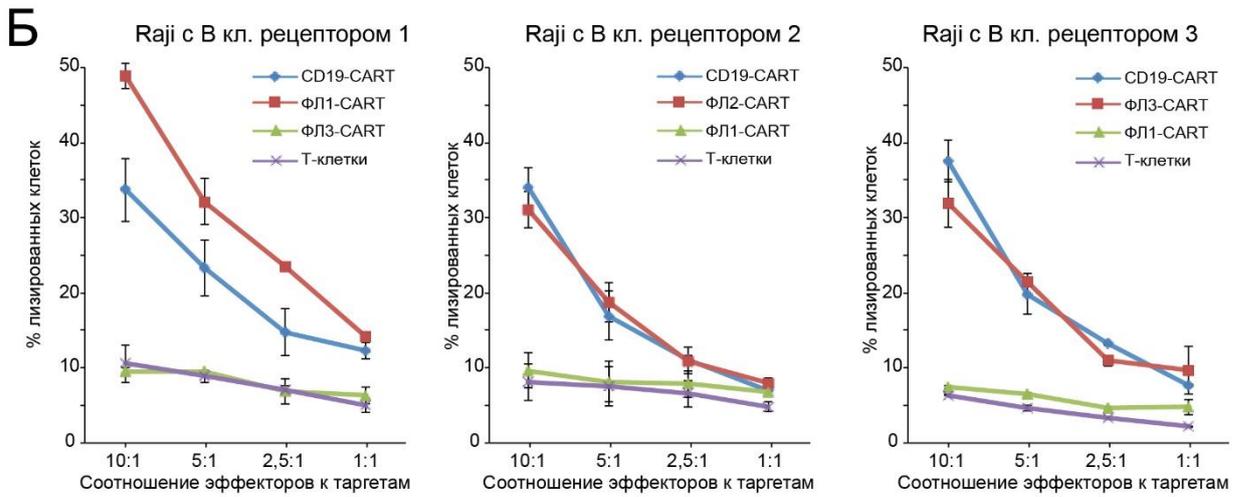
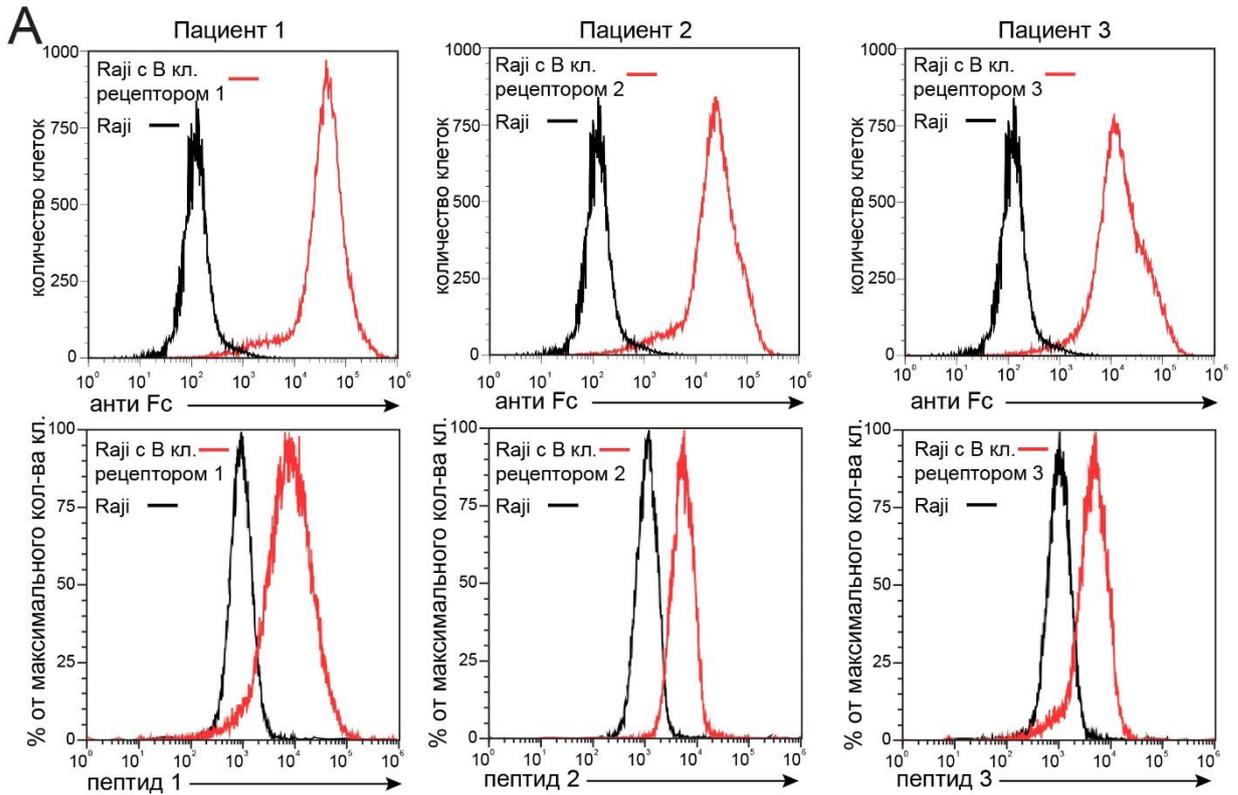


Рисунок 17 – Отобранные пептиды специфически взаимодействуют с В-клеточным рецептором и перенаправляют CAR T-клетки на уничтожение опухолевых клеток. А) Цитофлуорометрический анализ экспрессии В-клеточных рецепторов в формате заякоренного в мембране антитела на поверхности клеток Raji синтетическими биотинилированными пептидами (ФЛ1, ФЛ2, ФЛ3) и антителами анти IgG Fc. Нетрансдуцированные клетки Raji использовались в качестве контроля (черные гистограммы). Б) ФЛ-CAR-T были сокультивированы с клетками Raji, трансдуцированными восстановленными В-клеточными рецепторами. В качестве сравнения использовались мимно-трансдуцированные Т-клетки (Mock-T, Т-клетки) и классические CD19-CAR-T. Цитотоксичность определялась путем измерения высвобождения ЛДГ (лактатдегидогеназы) через 6 ч сокультивации. В) Клетки из биопсии пациента или контрольные В-клетки из биопсии другого пациента 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). Г) 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

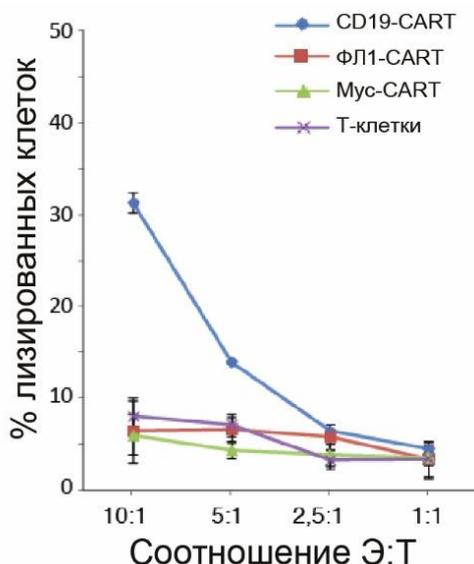


Рисунок 18 – ФЛ-CART не устраняют клетки Raji без экзогенного В-клеточного рецептора. CD-19 CART проявляет цитотоксичность в отношении обычных клеток Raji. Минимальный неспецифический лизис наблюдается, когда Т-клетки ФЛ1-CAR инкубировали с клетками Raji. Через 6 ч определялась цитотоксичность путем измерения высвобождения лактатдегидрогеназы

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

Эффективность ФЛ1-CAR-T была протестирована на модели фолликулярной лимфомы с использованием иммунодефицитных мышей (с диабетом без ожирения (NOD) и тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID; CB17-Prkdc^{scid}/NcrCr1)). Животным вводили подкожно в левый бок 5×10^6 клеток Raji с ФЛ1-B-клеточным рецептором (Raji-ФЛ1; Рисунок 19А). Инъекция 5×10^6 ФЛ1-CAR-T или CD19-CAR-T значительно снижала опухолевую нагрузку и улучшала выживаемость мышей по сравнению с контрольными группами, которым вводили Мус-CAR-T (Рисунок 19В и 19Г). CD19-CAR-T и ФЛ1-CAR-T проникали в солидные опухоли и предотвращали метастазирование ксенотрансплантата, в отличие от группы с введенными контрольными Мус-CAR-T (Рисунок 20).

На 37-й день 100% мышей из контрольной группы Мус-CAR-T были мертвы, в отличие от 80% выживших в группах ФЛ1-CAR-T и CD19-CAR-T (Рисунок 19В). С применением проточной флуориметрии было выявлено, что CAR-модифицированные Т-клетки сохраняются в периферической крови через 21 день после инфузии; количество ФЛ1-CAR-T и CD19-CAR-T значительно выше, чем в контрольной группе – Мус-CAR-T (Рисунок 19Г, вставка). Как и ожидалось, экспансия Т-клеток, экспрессирующих CD8⁺ CAR, коррелировала с экспрессией поверхностных маркеров, связанных с эффекторными фенотипами (Рисунок 19Д). Популяция ФЛ1-CAR-T в периферической крови состояла из эффекторных клеток памяти, тогда как селезенка и костный мозг были заселены центральными клетками памяти (Рисунок 19Е). Эти клетки играют важную роль в персистенции и устойчивой противоопухолевой активности.

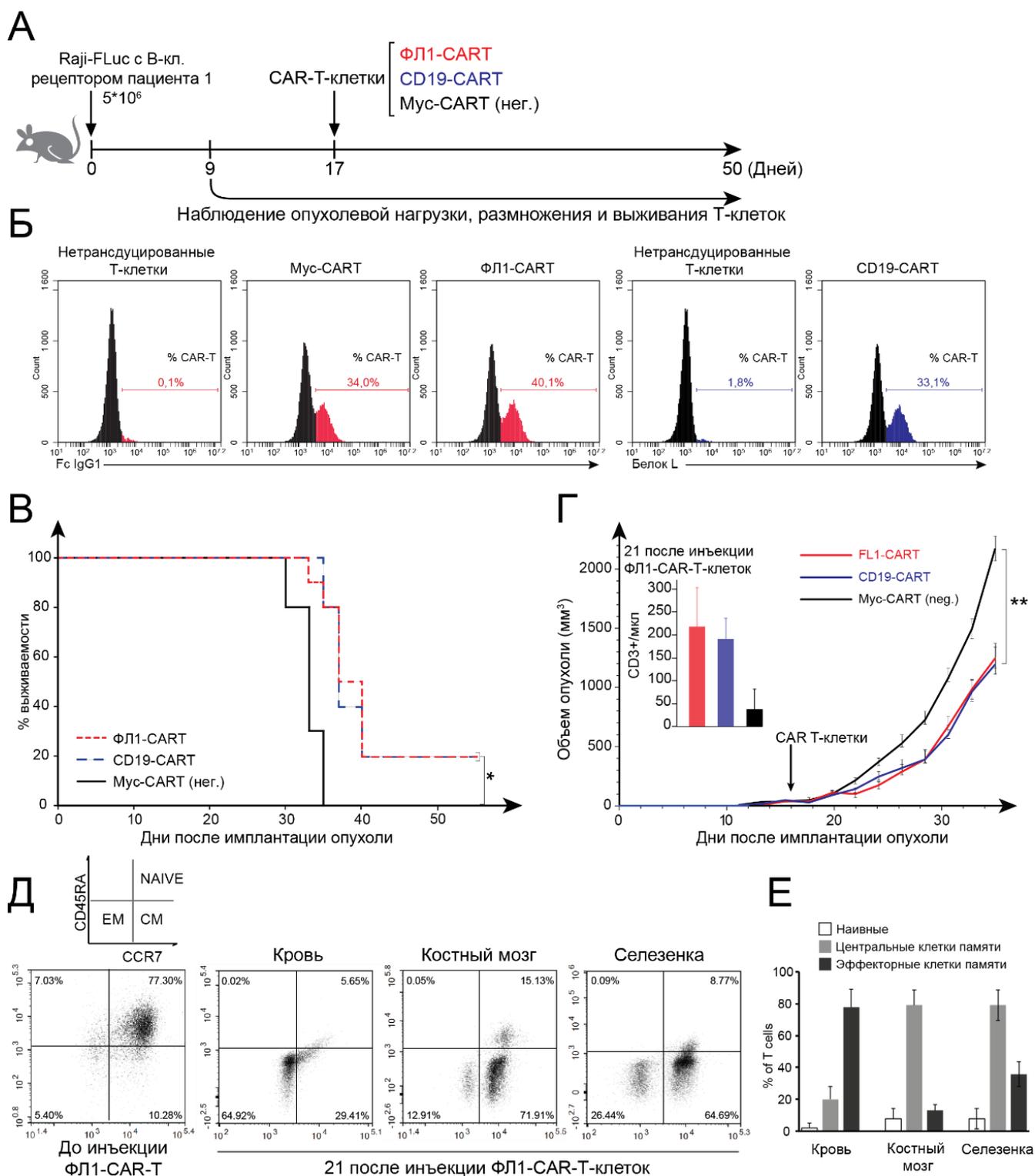


Рисунок 19 – ФЛ1-CAR-T подавляют лимфомагенез *in vivo*. А) Схема эксперимента. Мышам NOD SCID прививали 5×10^6 клеток Raji-ФЛ1 с В-клеточным рецептором пациента 1 в формате мембранного scFv. Затем на 15-й день животных рандомизировали по группам (по 12 мышей в группе) в соответствии с объемом опухоли. На 17-й день мышам внутривенно вводили 3×10^6 ФЛ1-CAR-T, CD19-CAR-T или Мус-CAR-T. Б) Оценка эффективности

трансдукции активированных CD8 + Т-клеток человека лентивирусными векторами: ФЛ1-CAR-T, Мус-CAR-T и CD19-CAR-T перед введением ФЛ1-CAR-T. 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) Кривая роста опухоли в группах мышей (n = 12), которым вводили внутривенно 3×10^6 ФЛ1-CAR-T, CD19-CAR-T или Мус-CAR-T на 17-й день после инъекции Raji-ФЛ1 (** P <0,05, непарный t – критерий Стьюдента). Гистограмма количества адаптивно перенесенных модифицированных Т-клеток в крови. Они получены с использованием специфических антител анти CD3 человека из ретроорбитальной пункции. Д) Проточный флуориметрический анализ фенотипа ФЛ1-CAR-T у мыши перед инъекцией и на 21-й день после инъекции. Е) Относительный процент наивных, центральных клеток памяти (СМ) и эффекторных клеток памяти (ЕМ) CAR-T на 21-й день после инъекции ФЛ1-CAR Т-клеток

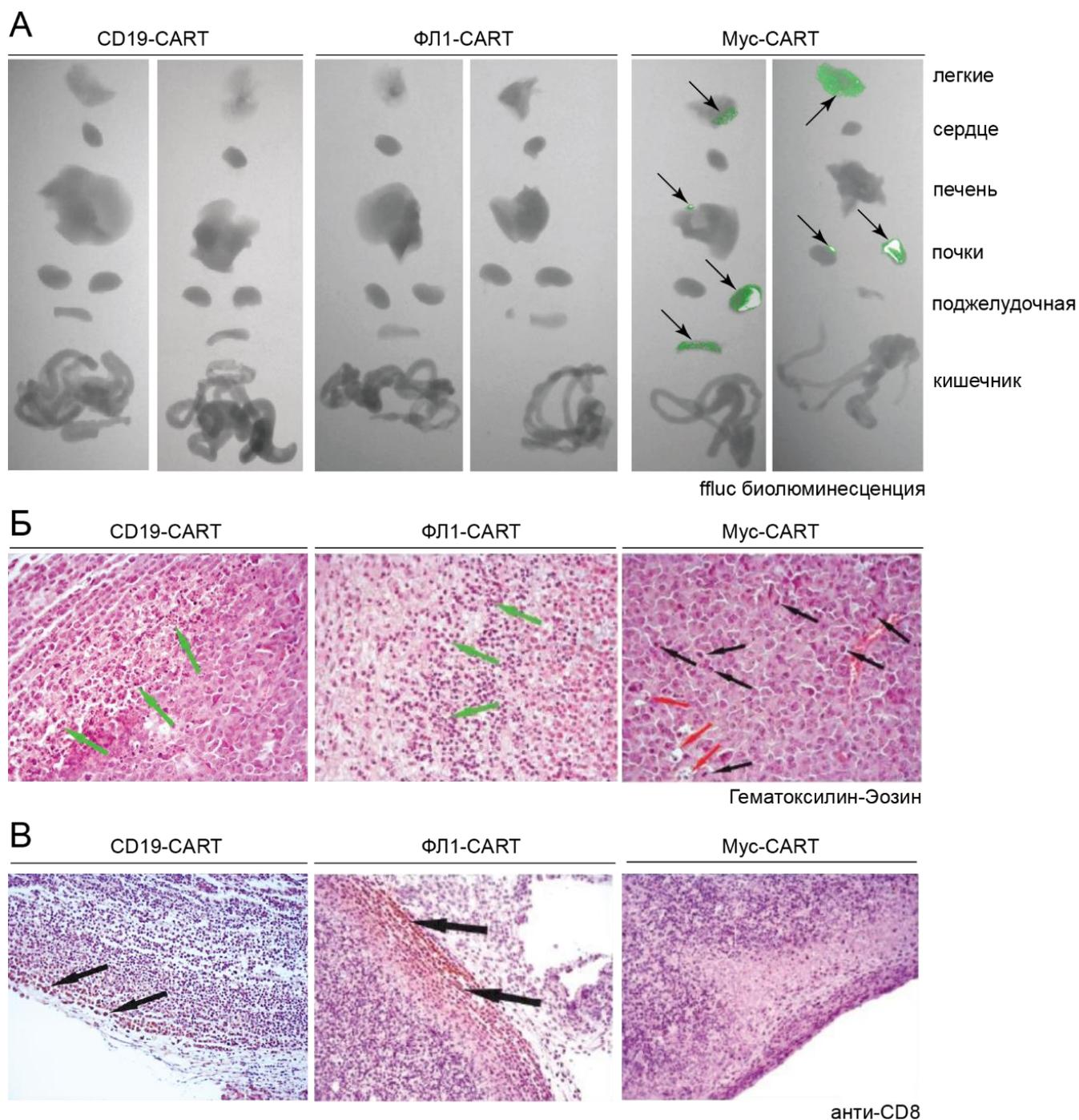


Рисунок 20 – ФЛ1-CAR-T проникают в солидные опухоли и предотвращают метастазирование ксенотрансплантата. А) Биолюминесцентная визуализация органов мышей, в которые попадают клетки Рајі-ФЛ1 (обозначено черными стрелками), на 35-й день после имплантации опухоли. Для обнаружения клеток Рајі-ФЛ1 мышам внутрибрюшинно вводили Д-люциферин. Б) Анализ гистопатологических изменений в опухолях у животных, которым вводили CD19-CAR-T, или ФЛ1-CAR-T, или Мус-CAR-T. Для выявления гистологических изменений опухоли окрашивали гематоксилин-эозином. В-клетки лимфомы с базофильной цитоплазмой и высокой скоростью митоза обозначены черными стрелками. Макрофаги, содержащие клеточные остатки, обозначены красными

стрелками. Клетки, предположительно находящиеся в состоянии апоптоза, обозначены зелеными стрелками. В) Иммуногистохимический анализ инфильтрующей опухоли CD19-CAR-T, ФЛ1-CAR-T или Мус-CAR-T (обозначено черными стрелками). Для окрашивания CAR-T использованы антитела, специфичные к CD8 человека

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 поверхностный пептид или белок опухолевой клетки. Здесь же используется обратное, специфичность CAR-T управляется пептидом, а мишенью является антитело. Наконец, нами обнаружена мишень для CAR Т-клеток, отличная от CD19, которая не только расширяет выбор специфичных CAR, но также может использоваться, когда CD19 отсутствует или подавляется, что может происходить у значительной части пациентов [149,232].

Для решения проблем, сопутствующих CAR-T терапии, было выбрано два направления исследований: преодоление ингибирующего эффекта микроокружения опухоли через взаимодействие PD-1/PD-L1 и создание метода контроля CAR Т-клеток через молекулу-посредника на основе взаимодействия барназы с барстаром.

4.2 Подавление PD-1 на Т-клетке для нарушения супресорного эффекта опухоли

Иммуносупрессивное микроокружение опухоли представляет собой серьезную проблему для разработки новых терапевтических подходов, основанных на адаптивной иммунотерапии, в том числе и для CAR-T-терапии. Т-клетки несут на своей поверхности иммунологические контрольные точки – супрессивные рецепторы, такие как CTLA-4 и PD-1, которые ограничивают их активацию и цитотоксичность. Экспрессия PD-1 индуцируется лигандом – PD-L1, который гиперэкспрессирует опухолевые клетки. Отрицательная передача сигналов, обеспечиваемая PD-1, приводит к активации протеинфосфатаз, которые дефосфорилируют мотивы ITAM, участвующие в стимуляции Т-клеток и эффекторной функции, такой как цитотоксичность. Следовательно, нарушение взаимодействия PD-1/PD-L1 приведет к исключению негативной костимуляции в CAR Т-клетках в строме опухоли. Этого можно достичь путем нокаутирования гена PD-1, снижением уровня транскрипции PD-1, нацеливанием на мРНК PD-1 для деградации и нарушением способности PD-1 связывать PD-L1 с помощью моноклональных антител к PD-1 или к PD-L1. Подходы, основанные на белковой инженерии поверхностных белков, очень многообещающие, поскольку напрямую влияют на события передачи сигналов, не затрагивая регуляцию транскрипции. В этом диссертационном исследовании использовали наноантитело (VНН) анти PD-1, экспрессируемое CD19 CAR-T клетками, для блокирования связывания PD-1 с PD-L1. Одним из способов применения VНН анти PD-1 является использование мотива PEBL [226], с которым VНН позволит предотвращать транспортировку PD-1 на поверхность мембраны (блокировка происходит внутри аппарата Гольджи или ЭПР). PEBL с VНН может объединяться с CAR в одной бицистронной конструкции, и тогда CAR-T могут быть получены после одной процедуры трансдукции, что не потребует значительных модификаций существующих протоколов для крупномасштабной наработки CAR Т-клеток на

клиническом уровне. Согласно нашим ожиданиям, удаление PD-1 с поверхности CAR T-клеток усилит передачу сигналов CAR, что приведет к уничтожению опухолевых клеток.

4.2.1 Создание репортерной клеточной системы для изучения PD-1/PD-L1 взаимодействия

Для изучения влияния передачи сигналов PD-1 / PD-L1 на активность и выживаемость CAR T-клеток была создана модельная система с использованием T-клеточной линии Jurkat NFAT LuciaTM (Jurkat). Сконструированы и созданы рекомбинантные векторы, экспрессирующие:

- CD19-специфический CAR19 (scFv клон FMC63);
- наноантитело, блокирующее PD-1 (VHH-PD-1), слитое с гибкими линкерами Fc или (G₄S)₃ и трансмембранным доменом PDGFR (αPD-1-Fc- PDGFR или αPD-1-GS- PDGFR);
- CAR19, отделенный от последовательности PD-1-VHH, слитое с мотивом PEBL для внутриклеточной блокировки, саморазрезающимся пептидом P2A (CAR19-P2A-αPD1(VHH)-PEBL) для одновременной трансляции (Рисунок 21).

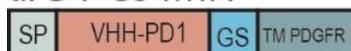
CAR19



αPD1-Fc-MTA



αPD1-GS-MTA



CAR19-T2A-αPD1-PEBL



Рисунок 21 – Схема лентивирусных конструкций, разработанных для стабильной экспрессии CAR и VHH анти-PD-1, где SP – это сигнальный пептид для выхода транслируемого белка в просвет ЭПР и дальнейшего экспонирования на поверхности мембраны клетки. FMC63 представляет собой: scFv антитела к

CD19, CD8 hinge – шарнирный линкер из молекулы CD8, GS – глицин-сериновый линкер ((G₄S)₃), TM – трансмембранный домен, 4-1BB – цитоплазматический домен активации от CD137, CD3ζ – цитоплазматический домен активации CD3-дзета, Fc – CH₂-CH₃ домены человеческого IgG1, PDGFR – мембранзакорявающий домен, P2A – пептидная последовательность саморасщепления и PEVL – мотив для внутриклеточного экспонирования в аппарате Гольджи или ЭПР наноантитела анти PD-1 (VHH-PD1)

Для подготовки репортерной клеточной системы клетки Jurkat были трансдуцированы лентивирусным вектором с геном PD-1. Положительные клетки по PD-1 были отсортированы с применением флуоресцентного антитела анти PD-1. В результате получилось два вида клеток – Jurkat без PD-1 и Jurkat с гиперэкспрессией PD-1. Эти клетки были модифицированы конструкциями, которые убирают PD-1, и проанализированы методом цитофлуориметрии с применением флуоресцентного антитела анти PD-1 (Рисунок 22).

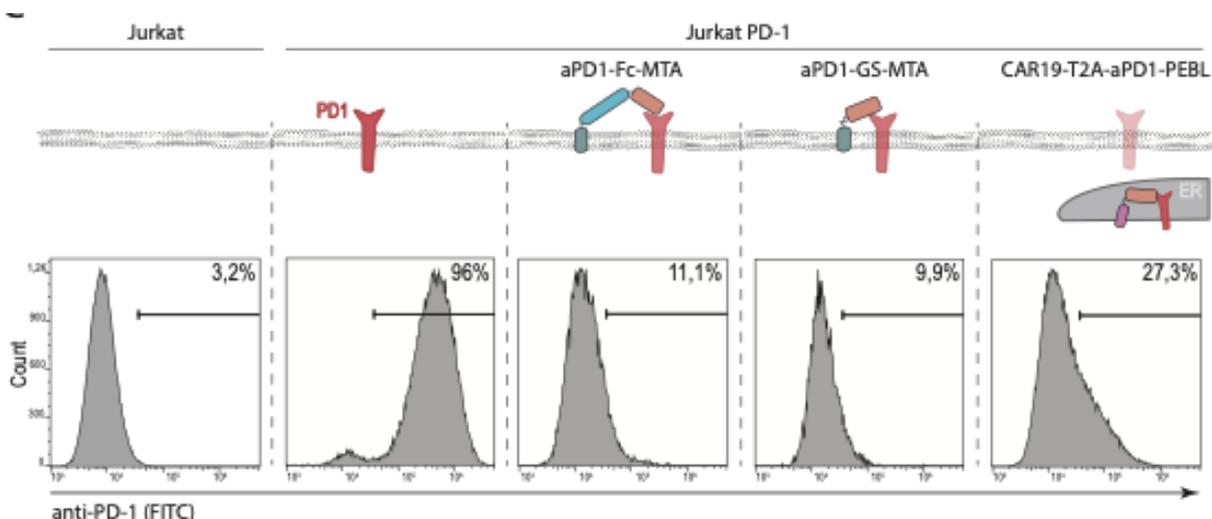


Рисунок 22 – Анализ поверхностной экспрессии PD-1 клетками Jurkat PD-1 после трансдукции лентивирусными конструкциями. Верхняя часть рисунка показывает локализацию вариантов PD-1 и VHH анти PD-1, закрепленных на клеточной мембране или в аппарате Гольджи / ЭПР, при использовании в конструкции мотива PEVL. Нижняя часть рисунка изображает меченные антителами клетки анти PD-1 через 48 ч после трансдукции. Анализ проводился при помощи проточной флуориметрии

Анализ показал, что клетки Jurkat-PD-1, по сравнению с контролем Jurkat, имеют более высокий уровень поверхностного PD-1. Введение поверхностно-

связанных, либо слитых с мотивом PEBL, VHH анти-PD-1 приводит к резкому уменьшению поверхностного окрашивания на PD-1. Однако, нельзя исключать, что, по крайней мере частично, окрашивание на PD-1 может быть заблокировано из-за параллельного взаимодействия PD-1 с VHH анти-PD-1.

Произведенная совместная экспрессия PD-1 с мембрано-связанным VHH анти-PD-1 с линкерами Fc и GS неожиданно вызвала плохую выживаемость клеток (Рисунок 23). Этот факт можно объяснить двумя причинами:

1. Потеря передачи сигналов через PD-1, которые могут защитить активированные Т-клетки от апоптоза.
2. Дополнительная передача сигнала в результате связывания VHH анти-PD-1 с PD-1.

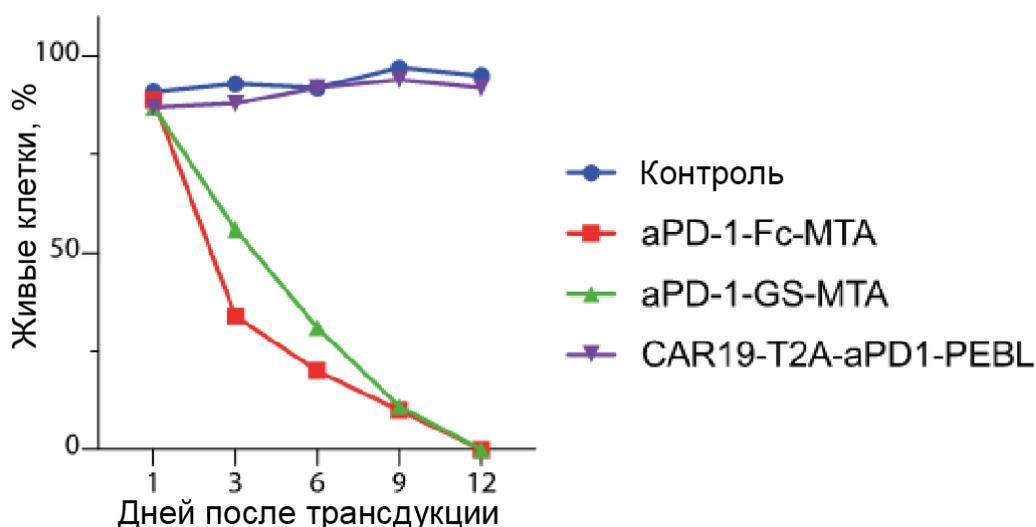


Рисунок 23 – Процент живых клеток Jurkat PD-1 по дням после трансдукции лентивирусами, с генами блокаторов PD-1. В качестве контроля используются немодифицированные клетки Jurkat

Низкая выживаемость трансдуцированных клеток Jurkat мембранным VHH анти-PD-1 заставила сосредоточиться на исследовании по изучению блокирования PD-1 с поверхности клетки на Jurkat, модифицированных CAR19-P2A-aPD-1-PEBL (Рисунок 23). Было выдвинуто предположение, что такая выживаемость происходит при неполной потере поверхностного PD-1. Возможно, что часть PEBL-заякоренного PD-1 может возвращаться к плазматической

мембране из ЭПР / аппарата Гольджи. Перед функциональными экспериментами было продемонстрировано, что трансдукция Jurkat конструкцией CAR19-P2A-aPD-1-PEBL приводит к дозозависимым изменениям уровня CAR и PD-1 (Рисунок 24). В экспериментах были использованы различные количества лентивирусного супернатанта. В итоге было обнаружено, что увеличение экспрессии CAR19 на поверхности трансдуцированных клеток сопровождается снижением уровня PD-1. Это указывает на то, что клетки, экспрессирующие CAR, действительно имеют низкий уровень PD-1 на поверхности.

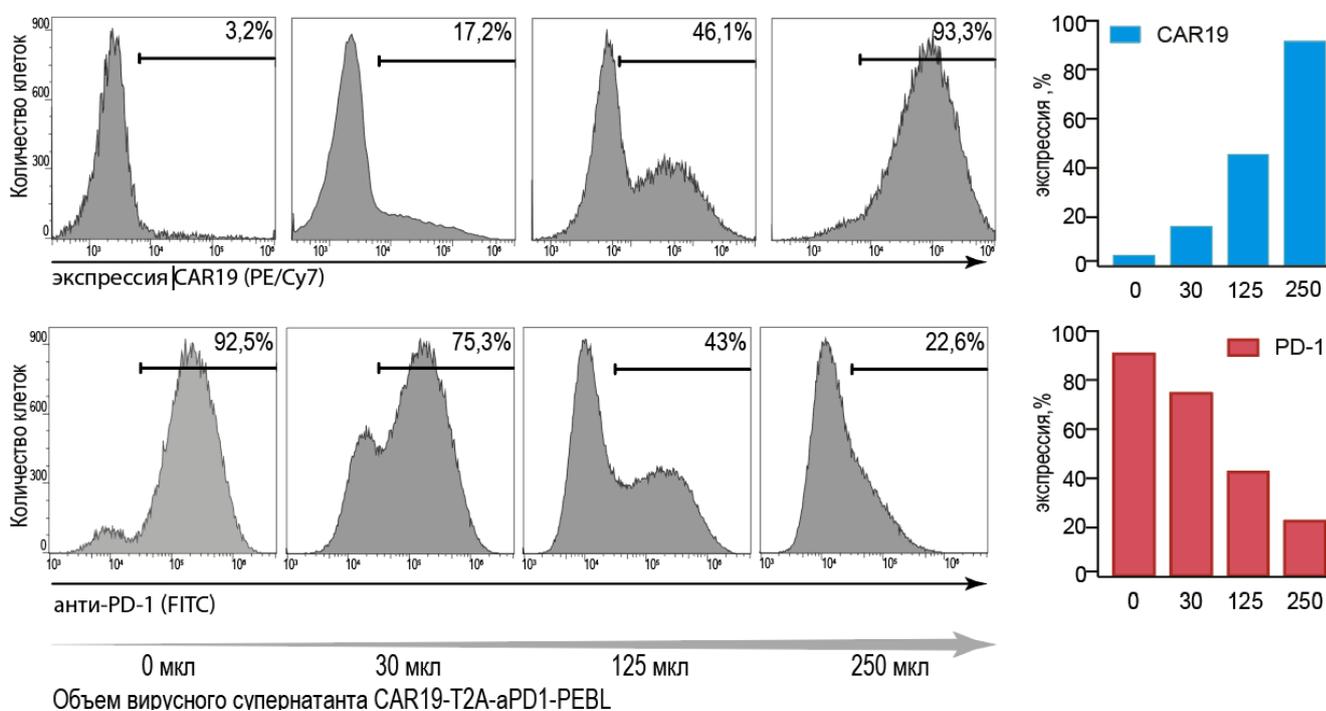


Рисунок 24 – Цитофлуориметрическое окрашивание клеток Jurkat с трансдукцией разным количеством лентивирусного супернатанта CAR19-P2A-aPD-1-PEBL. Для трансдукции были использованы клетки Jurkat PD1. Через 72 ч после трансдукции вирусами CAR19-P2A-aPD-1-PEBL клетки были проанализированы антителами анти CAR19 и PD-1, конъюгированными с флуоресцентными метками PE/Cy7 и FITC, соответственно

4.2.2 Функциональный тест конструкции, снижающей уровень PD-1, на репортерной клеточной системе

Для проведения функционального теста по снижению уровня PD-1 была использована панель репортерных клеток Jurkat и Jurkat PD-1, трансдуцированных лентивирусами с CAR19 или с CAR19-P2A-aPD-1-PEBL. В качестве клеток-мишеней использовали CD19 положительную линию лимфомных В-клеток Nalm-6 и Nalm-6, трансдуцированную лентивирусами PD-L1. Поскольку взаимодействие PD-1 / PD-L1 обеспечивает отрицательный сигнал, опосредованный протеинфосфатазой SHP-1, то и передача сигналов от CAR будет ослаблена, что приведет к снижению активности промотора NFAT, контролируемого NF- κ B. Под промотором NFAT использовался секретируемый вариант люциферазы светлячка, по активности которой можно количественно оценить активацию клеток с CAR (Рисунок 25 А).

Полученные линии репортерных клеток Jurkat инкубировали с Nalm-6, которые гиперэкспрессируют PD-L1, или с немодифицированными Nalm-6 дикого типа. После 48 ч инкубации были собраны аликвоты культуральной среды и измерена активность люциферазы. Гиперэкспрессия PD-1 и PD-L1 в Jurkat CAR19 и клетках-мишенях Nalm-6, соответственно, привела к резкой потере активности люциферазы по сравнению с контролем (низкий PD-1 с низким PD-L1 или высокий PD-1 с низким PD-L1) (Рисунок 25Б). Удаление PD-1 внутриклеточным aPD-1-PEBL с поверхности Jurkat-CD19 приводило к восстановлению секреции люциферазы.

Результаты этого эксперимента продемонстрировали, что клетки CD19 CAR-T с ограниченной поверхностной экспрессией PD-1 за счет VHN с мотивом PEBL секретируют больше люциферазы, чем контрольная линия клеток, которая гиперэкспрессирует PD-1. Это открытие предполагает, что удаление PD-1 с поверхности приводит к усиленной активации CAR Т-клеток в присутствии клеток-мишеней.

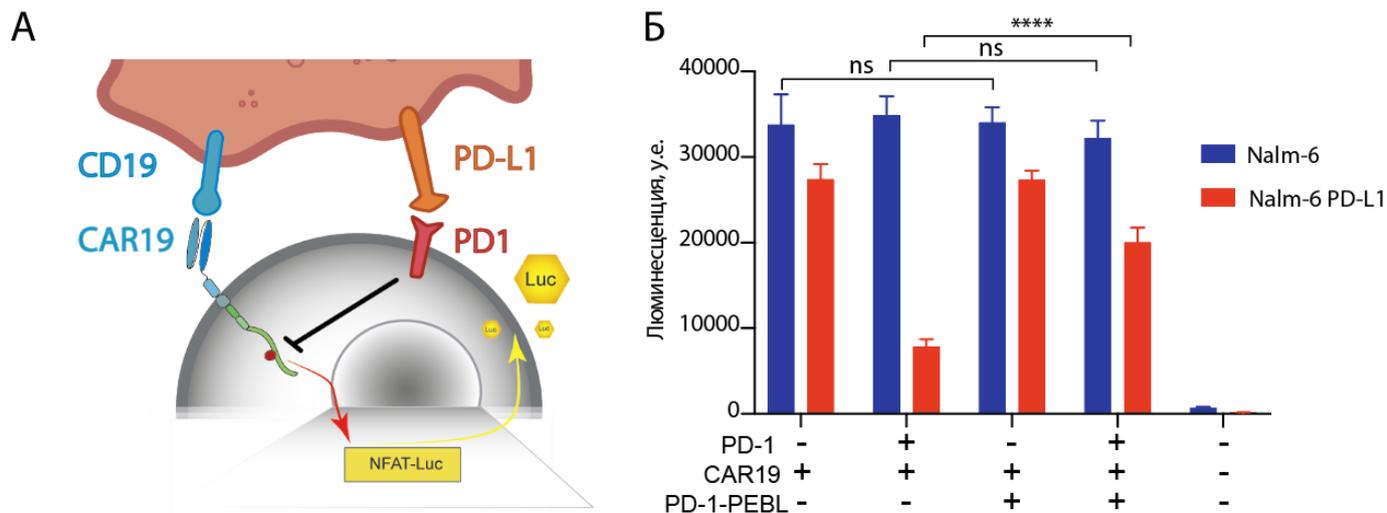


Рисунок 25 – Репортерная клеточная система для оценки PD-1/PD-L взаимодействия на основе Jurkat NFAT Lucia™. А) Схематическое изображение репортерной системы Jurkat NFAT Lucia™ PD-1 CAR19 с Nalm-6 PD-L1. Б) Анализ активации Т-клеток CAR19 по люциферазной активности. PD-1-положительные и отрицательные клетки Jurkat были модифицированы CAR19 или CAR19-P2A-aPD-1-PEBL, а затем совместно инкубированы с Nalm-6 и Nalm-6 PD-L1. Через 48 ч после начала совместной инкубации 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: **** $p < 0,0001$

4.2.3 Анти-PD-1 наноантитело-PEBL удаляет PD-1 с поверхности Т-клеток человека

Чтобы продемонстрировать, что анти-PD-1 VHH-PEBL также эффективно блокирует PD-1 на Т-клетках как и на репортерной клеточной системе Jurkat, были выделены CD3-положительные Т-клетки человека из периферической крови. Их трансдуцировали лентивирусными частицами CD19 CAR-P2A-aPD-1-PEBL или CD19 CAR (Рисунок 26). Клетки, экспрессирующие CD19 CAR-P2A-aPD-1-PEBL, показывают низкий уровень поверхностного PD-1 по сравнению с контрольными клетками, экспрессирующими только CD19 CAR. Полученные CAR-Т клетки далее были использованы в функциональном тесте с последовательным добавлением CD19 положительных клеток-мишеней.

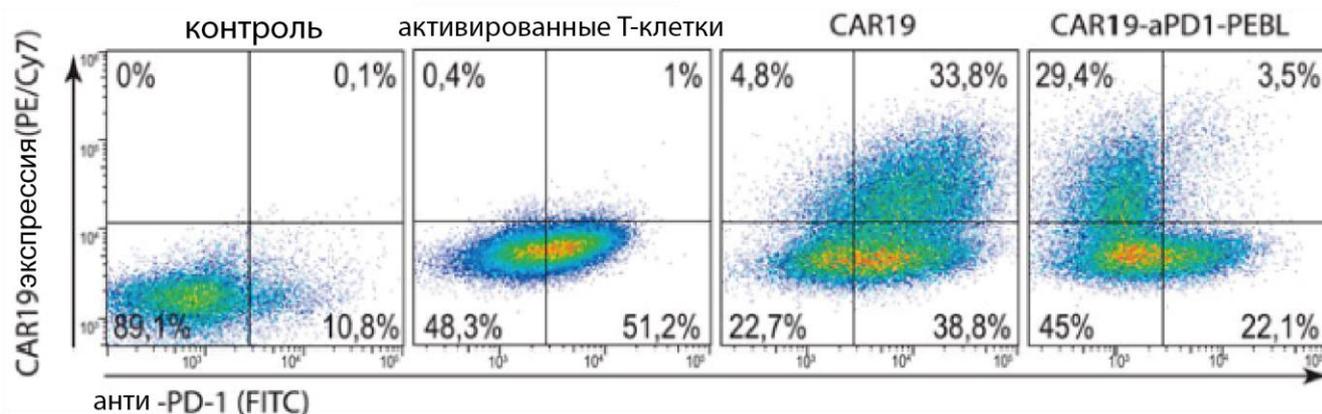


Рисунок 26 – Экспрессия конструкции CD19 CAR-P2A-aPD-1-PEBL в Т-клетках эффективно убирает PD-1. Неактивированные и активированные Т-клетки человека, трансдуцированные CAR19 и CAR19-P2A-aPD-1-PEBL, анализировали на предмет поверхностной экспрессии PD-1 и CAR19 с помощью проточной цитофлуориметрии

Параллельное сравнение CAR19-P2A-aPD-1-PEBL и контрольных CD19 CAR-T 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 (Рисунок 27А). Но когда добавляются свежие клетки-мишени CD19 CAR-T aPD-1-PEBL Т-клетки быстрее теряют свою цитотоксичность по сравнению с контрольными CAR-T с высоким уровнем PD-1 (Рисунок 27А).

4.2.4 Популяция клеток CD19 CAR-T с низким PD-1 имеют более высокую долю терминально дифференцированных и истощенных клеток

Как упоминалось ранее, удаление PD-1 с поверхности клетки приводит к плохой выживаемости Т-клеток CAR19. Чтобы выяснить причину этого нежелательного эффекта, была изучена экспрессия маркеров дифференцировки, а также маркеров, характерных для истощения Т-клеток с высоким и низким уровнем PD-1. Дифференциацию CAR Т-клеток оценивали путем иммунофенотипирования антителами анти CD62L и CD45RA. Определялся

фенотип CAR19 или CAR19-P2A-aPD-1-PEBL Т-клеток, взятых на 9-й день проведения эксперимента, и цитотоксичность против Nalm-6 или Nalm-6 PD-L1. Результаты эксперимента продемонстрировали, что популяция CAR Т-клеток с низким уровнем PD-1 содержит больший процент терминально дифференцированных клеток (Рисунок 27Б). CAR19-P2A-aPD-1-PEBL Т-клетки имели самую высокую долю эффекторных Т-клеток памяти (ЕМ) по сравнению с контрольными CD19 CAR-Т. В дополнение к накоплению ЕМ-клеток, Т-клетки CAR19-P2A-aPD-1-PEBL имели повышенную долю TIGIT-положительных клеток (Рисунок 27В). Экспрессия TIGIT (Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM) повышается в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах CD8, которые имеют истощенный фенотип и соответствующую сниженную передачу иммунных сигналов [233–236]. Эта молекула также связана с истощенным дисфункциональным фенотипом человеческих CAR Т-клеток, и, как PD-1, считается негативным регулятором активации Т-клеток.

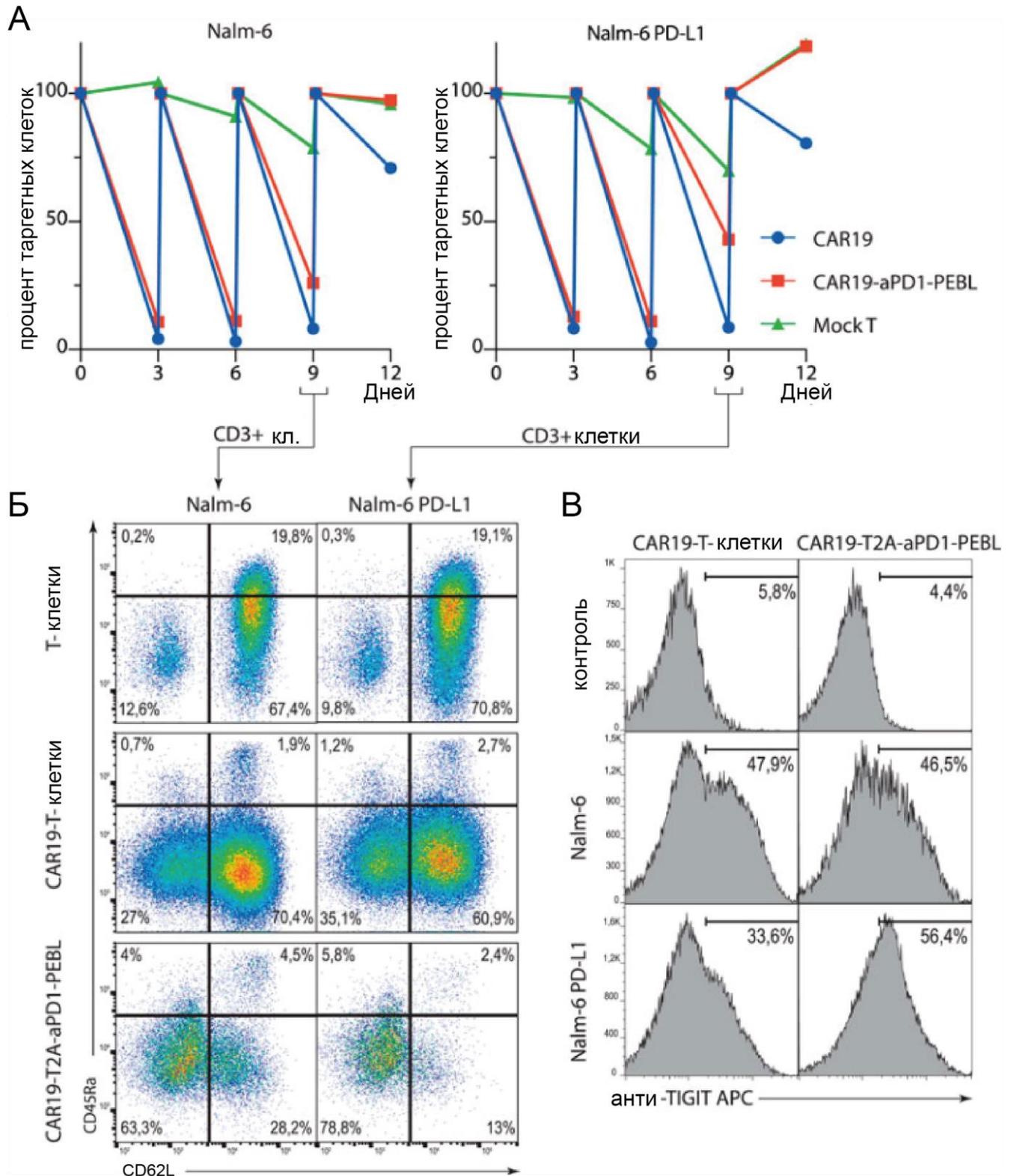


Рисунок 27 – Блокирование поверхностной экспрессии PD-1 посредством CAR19-P2A-aPD-1-PEBL в Т-клетках приводит к повышенной активации и истощению. А) Анализ последовательного цитотоксического теста Т-клеток CAR19 или CAR19-P2A-aPD-1-PEBL, инкубированных с клетками-мишенями PD-L1 Nalm-6 или Nalm-6, экспрессирующими GFP, в соотношении 1:4 в течение 12-ти дней.

Количество клеток-мишеней на лунку анализировали каждые 3 дня с помощью проточной цитометрии. Б) Проточный цитофлуориметрический анализ фенотипа Т-клеток CAR19 и CAR19-P2A-aPD-1-PEBL, инкубированных с Nalm-6 или Nalm-6 PD-L1, на 9-й день. В) Количественное определение CAR19 и CAR19-P2A-aPD-1-PEBL Т-клеток, экспрессирующих маркер истощения TIGIT, среди клеток CD3 + в образцах из (А) на 9-й день

В ходе проведенных экспериментов пришли к выводу, что удаление PD-1 с поверхности CD19 CAR-T вызывает повышенную активацию, более быстрое созревание и функциональное истощение Т-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 коинкубации CAR-T с клетками-мишенями [237,238]. Более того, в другом исследовании показали, что длительная блокада PD-1 приводит к более быстрому истощению CAR Т-клеток [184]. Возможно, клетки CAR-T более чувствительны к стимулированию апоптоза в отсутствие сигнала PD-1, который обычно ослабляет сильный сигнал через CAR. На быстрое истощение мог повлиять способ получения CAR-T. В нашем эксперименте CAR-T получали при классической активации антителами CD3/CD28 на магнитных шарах и добавлением ИЛ-2 при наработке популяции, тогда как было показано в других исследованиях, что предварительная обработка Т-клеток ИЛ-7 и ИЛ-15 или ИЛ-15 и ИЛ-21 приводят к большему содержанию в популяции Т-клеток памяти [68]. Такая обработка Т-клеток при производстве CAR-T в нашем исследовании могла уменьшить истощение CAR-T, с заблокированным PD-1.

В итоге, как это ни парадоксально, снижение негативной передачи сигналов привело к ухудшению выживаемости и дисфункции CAR Т-клеток, по крайней мере, в нашем исследовании *in vitro*. Результат экспериментов доказывает, что для продления активности CAR-T 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.

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

Для усиления эффективности и безопасности лечения онкологических заболеваний необходимо контролировать активность терапевтических клеток. Использование молекулы-посредника способно обеспечить данный контроль. Также при применении панели молекул-посредников появляется возможность нацеливания на разные антигены. Здесь мы предлагаем использовать РНКазу-барназу в качестве нацеливающего модуля, который сам по себе обеспечивает цитотоксические эффекты. Барназа и ее антитоксин барстар представляют собой уникальный пример молекулярного распознавания, взаимодействуют между собой с исключительно высокой скоростью и сродством [211]. Сущность данного подхода заключается в том, что с опухолевым антигеном взаимодействует направляющая молекула – дарпин, слитая с барназой. В свою очередь, с барназой с высоким сродством взаимодействует барстар, который входит в состав CAR, экспрессирующийся в модифицированных клетках. Такой подход позволит контролировать цитотоксичность и чувствительность CAR T-клеток к антигену на поверхности опухолевых клеток (Рисунок 28).

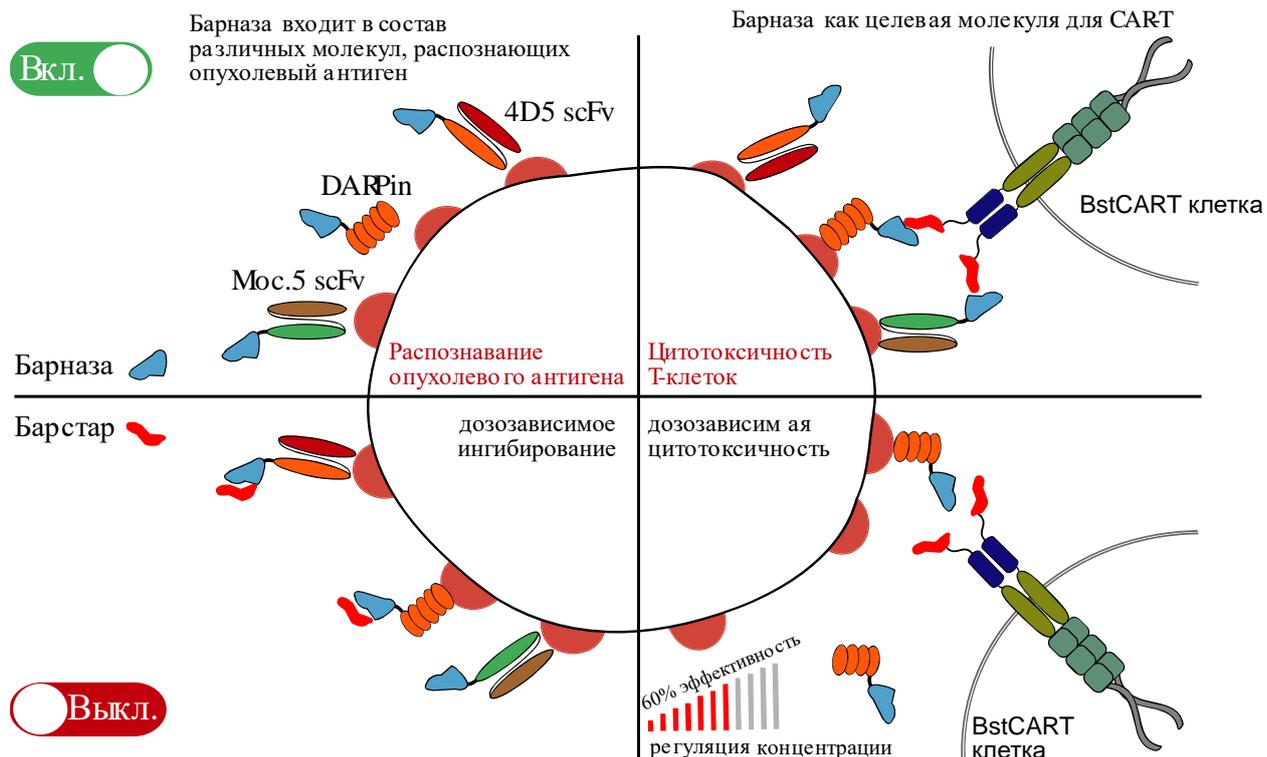


Рисунок 28 – Схема использования модульной системы CAR-T на основе взаимодействия барназы с барстаром. Барназа, слитая с направляющей молекулой (ScFv, наноантитело, дарпин, распознающие TAA) – молекула-посредник. Барстар в составе CAR позволяет активировать модифицированные Т-клетки в присутствии молекул-посредников

4.3.1 Разработка молекул-посредников модульной системы

В качестве опухолевого антигена выбрали рецептор эпидермального фактора роста 2 типа (HER2). Это – один из маркеров злокачественных солидных опухолей, который гиперэкспрессирован клетками рака молочной железы, желудка, яичника, толстой кишки, мочевого пузыря, легких, шейки матки, головы, шеи и пищевода. Клеточная линия BT474, полученная из солидной инвазивной проточной карциномы молочной железы, гиперэкспрессирующая HER2, была выбрана нами в качестве таргетной.

Дарпины G3 и 9.29, специфичные к HER2 и слитые с барназой, были получены в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН и любезно

предоставлены д.б.н. академиком РАН, профессором С. М. Деевым [239]. Дарпины G3 и 9.29 взаимодействуют с различными доменами рецептора HER2 (Рисунок 29А). G3 связывается с мембранно-проксимальным доменом IV HER2, тогда как 9.29 взаимодействует с мембранно-дистальным субдоменом I с $K_D = 0,09$ нМ [240] и $K_D = 3,8$ нМ [208] соответственно. Эти молекулы-посредники были помечены флуоресцентной меткой FITC. Подобно терапевтическому моноклональному антителу анти HER2 трастузумабу, рекомбинантные белки G3-барназа и 9.29-барназа специфически взаимодействуют с HER2-положительной линией клеток BT-474, что визуализировано на конфокальной микроскопии (Рисунок 29Б). Также было подтверждено специфическое взаимодействие с BT-474, продемонстрированное с использованием проточной цитометрии, причем окрашивание не наблюдалось на клетках эпителиального рака молочной железы человека – MDA-MB-231 с нормальной экспрессией HER2 и с HER2-отрицательными клетками СНО хомяка (Рисунок 29В). Так как барназа – это РНКаза, то было необходимо проанализировать уровень РНКазной активности G3-барназы и 9.29-барназы в сравнении со свободной барназой (Рисунок 30), где $EC_{50} = 6,1$ нМ, $3,6$ нМ и $2,2$ нМ соответственно. 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 29Г).

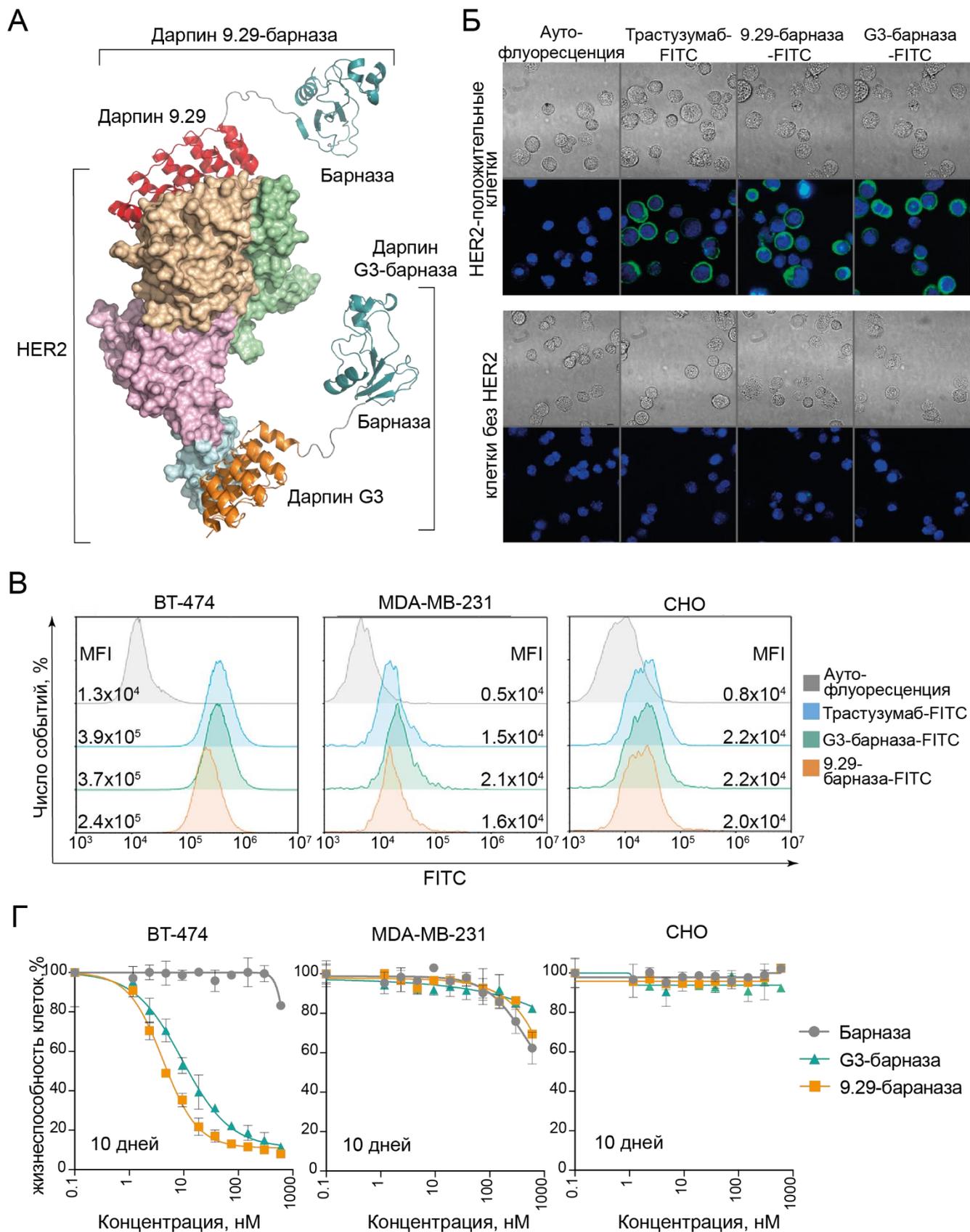


Рисунок 29 – Структура и функциональная активность молекул-посредников – дарпин-барназ. А) Структурная модель, иллюстрирующая взаимодействие между внеклеточным доменом HER2 и молекулами-

посредниками – G3-барназой и 9.29-барназой. HER2 – идентификатор PDB: 1N8Z, G3 – идентификатор PDB: 4HRN и 9.29 – идентификатор PDB: 4HRL, барназа – идентификатор PDB: 1BRS. Б, В) Дарпин-барназы специфически связываются с поверхностью HER2-положительных клеток. Б) Конфокальная сканирующая микроскопия. Верхняя панель – световое поле. Нижняя панель – наложение FITC ($\lambda_{ex} = 488$ нм, $\lambda_{em} = 492-550$ нм) и Hoechst33342 ($\lambda_{ex} = 405$ нм, $\lambda_{em} = 410-520$ нм). В) Проточная цитометрия. Гистограммы показывают распределение флуоресценции немеченых (аутофлуоресценция – гистограмма серого цвета) и меченых клеток. HER2-положительные клетки BT-474, клетки MDA-MB-231 с низким уровнем экспрессии HER2 и контрольные HER2-отрицательные клетки – CHO. Окрашивание выполняли мечеными FITC – 9.29-барназой или G3-барназой. В качестве положительного контроля использовали антитело к HER2 – трастузумаб, конъюгированное также с FITC. Г) Анализ жизнеспособности резазурином клеток BT-474, MDA-MB-231 и CHO, которые обработали 9.29-барназой, G3-барназой и свободной барназой. Молекулы-посредники вызывают специфическую цитотоксичность HER2-позитивных клеток при продолжительной инкубации – 10 дней. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение

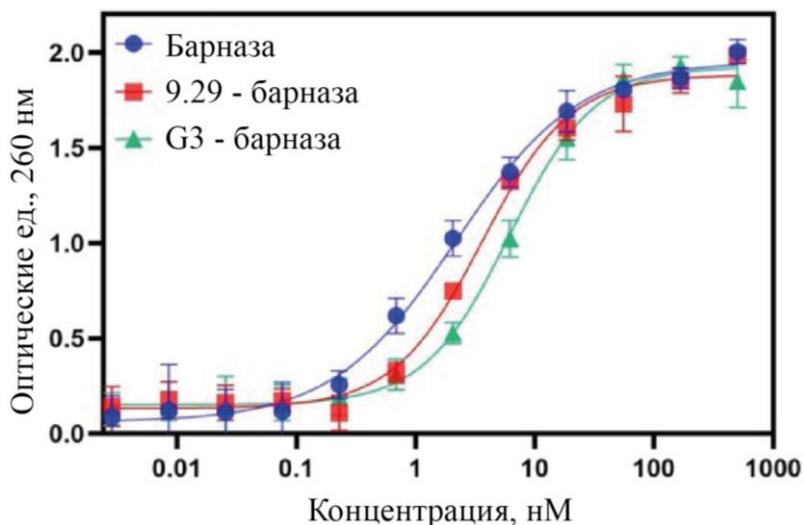


Рисунок 30 – Ферментативная активность дарпинов G3 и 9.29, слитых с барназой. Оптическая плотность, соответствующая концентрации свободных мононуклеотидов и пропорциональная РНКазной активности образцов, измерялась при $\lambda = 260$ нм. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение

4.3.2 Разработка и тестирование CAR

На внешней внеклеточной части CAR, связывающей барназу, находится барстар (Рисунок 31 и 32Б). Для оптимизации внеклеточного домена CAR была создана группа мутантных форм барстара. Аминокислотная последовательность барстара содержит неспаренные цистеины (C40 и C82) и изолейцин 87 (Рисунок 31, 31А), что способно привести к гомодимеризации [211,241,242]. Димеризация барстара может мешать взаимодействию его с барназой. Более того, взаимодействие дарпин-барназы с барстаром в контексте CAR требует определенной гибкости, которая может быть достигнута путем встраивания пептидных линкеров [243–245]. 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 3X(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 31, 31А и 31Б). Все варианты CAR имели мутированный шарнир IgG4 с двумя точечными мутациями (L235E; N297Q) для подавления взаимодействия с Fc-рецепторами и обеспечения персистенции CAR Т-клеток [54]. В состав CAR также входят мембранный и внутриклеточный домен молекулы CD28, внутриклеточный цитоплазматический домен активации от 4-1BB (CD137) и от CD3ζ (Рисунок 32Б). Все варианты BsCAR, за исключением BsCARv5, были обнаружены на поверхности Т-клеток на одинаковых уровнях при окрашивании линкера IgG4 специфичными антителами с флуоресцентной меткой DyLight650 (Рисунок 32Б слева). Т-клетки BsCAR окрашивали дарпином 9.29-барназа-FITC, чтобы определить, какой вариант BsCAR сохранил способность взаимодействовать с барназой. Только четыре из шести вариантов BsCAR (v2, v3, v4 и v6) эффективно взаимодействовали с барназой (Рисунок 32Б справа), а BsCARv4 продемонстрировал самое сильное связывание.

Был проведен функциональный тест на цитотоксичность вариантов BsCAR по отношению к клеткам BT-474 в присутствии 1 нМ 9.29-барназы или G3-барназы (Рисунок 32Г). 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 более эффективно, чем другие варианты BsCAR ($p < 0,0001$). Для проведения дальнейших экспериментов был выбран BsCARv4 ввиду его лучшей экспрессии на поверхности клеточной мембраны (Рисунок 32В слева), связывания барназы (Рисунок 32В справа) и высокой цитотоксичности (Рисунок 32Г). Эффективность передачи сигнала BsCARv4 была подтверждена анализом активации репортерных Т-клеток: $EC_{50} = 0,1 \pm 0,02$ нМ с 9.29-барназой (Рисунок 33).

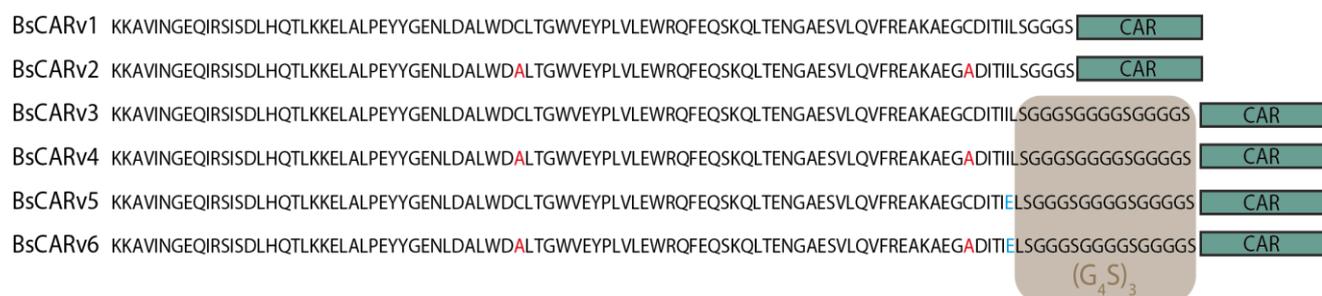


Рисунок 31 – Последовательности мутантов барстара и линкер, использованные для создания участка BsCAR, связывающего барназу. Варианты: 1 строка последовательности нуклеотидов – дикий тип, 2 строка – мутант цистеиналанина (C40 и C82), 3 строка – дикий тип с удлинённым гибким шарниром 3X(G₄S), 4 строка – мутант цистеиналанина (C40 и C82) с удлинённым гибким шарниром 3X(G₄S), 5 строка – мутант I87 (I87E) с удлинённым гибким шарниром 3X(G₄S), 6 строка – двойной мутант (C40, C82 и I87E) с удлинённым гибким шарниром 3X(G₄S)

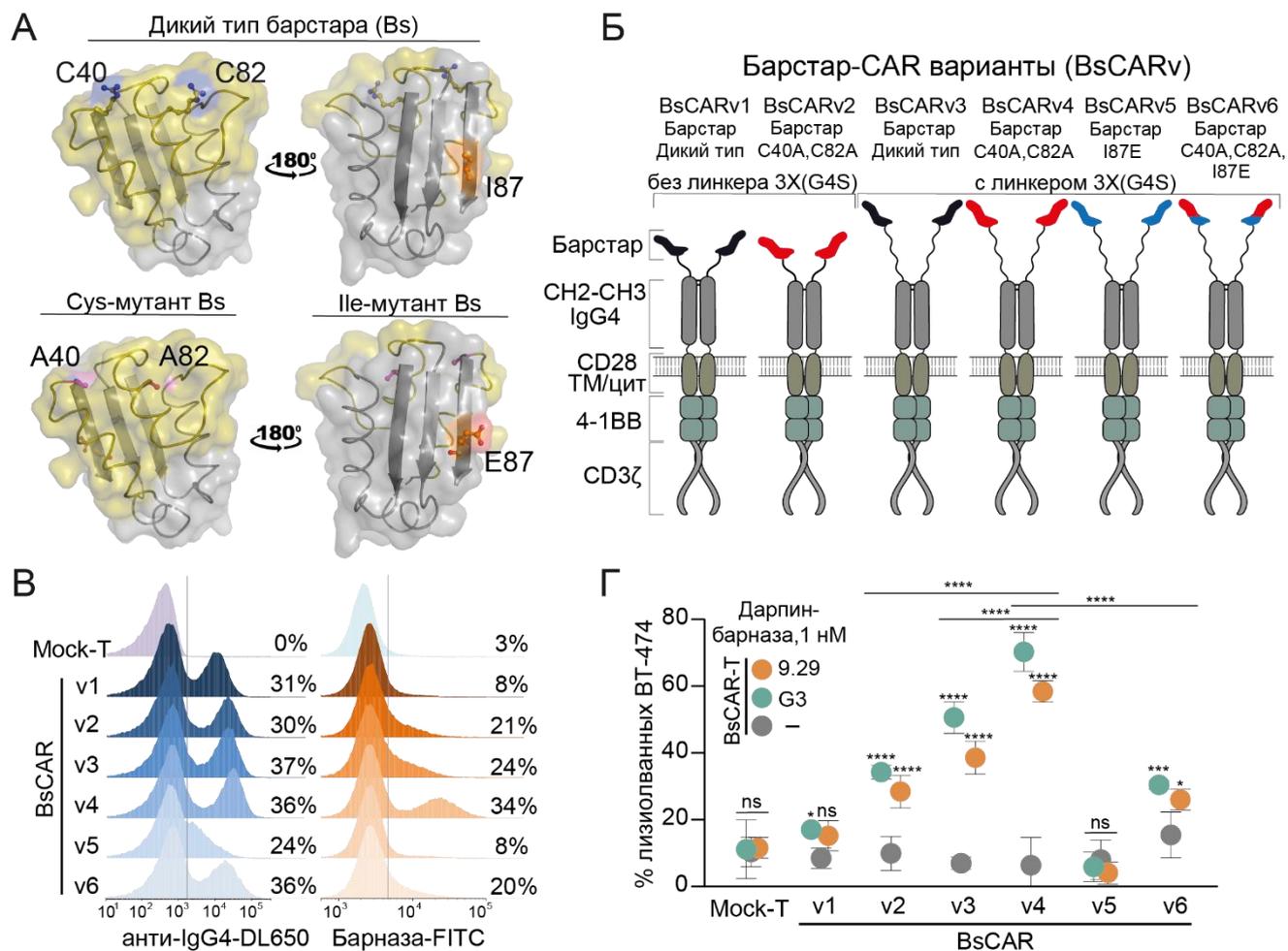


Рисунок 32 – Дизайн и характеристика модульных CAR T-клеток на основе взаимодействия барназы с барстаром. А) Модель трехмерной структуры барстара (Bs) (идентификатор PDB: 1BRS [216]), где указаны мутации вариантов BsCAR. Поверхность, окрашенная желтым цветом, представляет собой интерфейс для взаимодействия с барназой. Аминокислоты в местах мутаций представлены шариками и палочками. Б) Панель вариантов BsCAR. Barstar (Bs), (G3S): линкер Gly-Ser, CD28 TM/цит: трансмембранный и цитоплазматический домены CD28, 4-1BB: домен цитоплазматической активации из CD137, CD3zeta: домен цитоплазматической активации CD3 дзета. В) Уровень BsCAR на поверхности T-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 BT-474, индуцированный добавлением 1 нМ 9.29-барназы, G3-барназы или отсутствием молекул-посредников. Соотношение BsCAR-T:BT-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

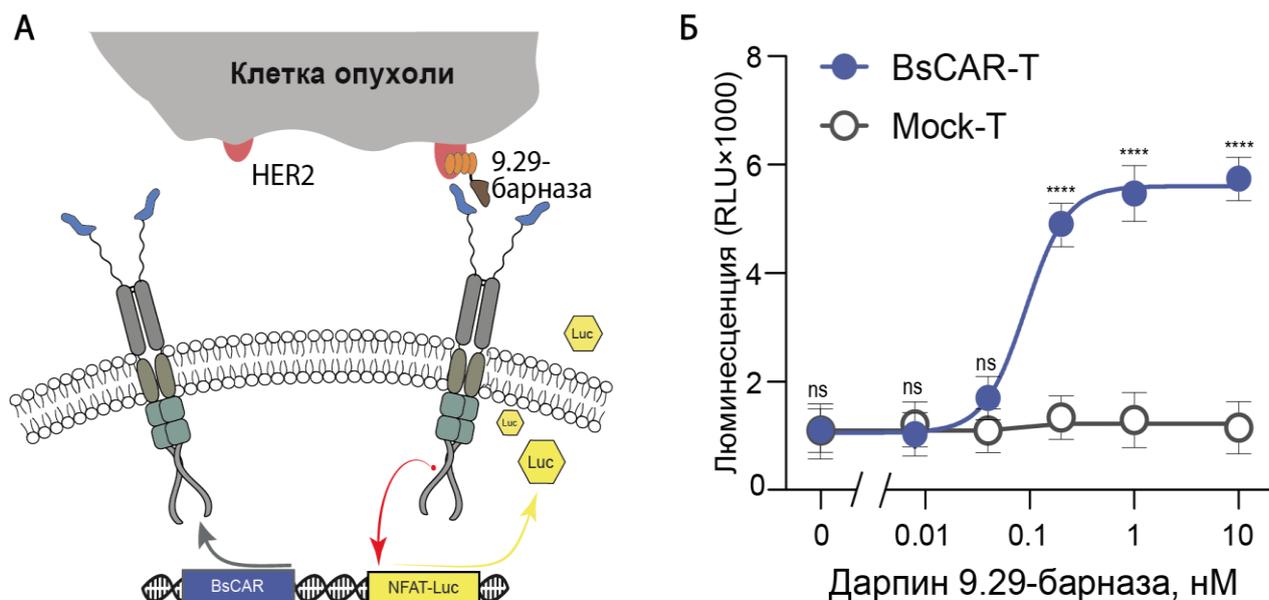


Рисунок 33 – Анализ люциферазы с помощью репортерных клеток.

А) Диаграмма, иллюстрирующая анализ репортерной люциферазы BsCAR Jurkat. Репортерный ген люциферазы находится под контролем промотора NFAT.

Б) HER2-положительные клетки BT-474 совместно инкубировали с репортерными клетками BsCAR Jurkat в присутствии повышающихся концентраций 9.29-барназы в течение 24 ч (соотношение эффектор:опухолевые клетки 10:1) (n=3). Данные проанализированы с помощью двустороннего дисперсионного анализа с множественными сравнениями Сидака и представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Статистическая значимость: ****p < 0,0001

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

Используя набор молекул-посредников T-клетки BsCAR можно нацеливать не только на разные части антигена, но даже на другие антигены. Кроме того, за счет изменения концентрации молекул-посредников, можно осуществлять регуляцию активности T-клеток BsCAR (Рисунок 34А). Дозависимый эффект наблюдали при изменении концентрации 9.29-барназы и G3-барназы и соотношения клеток (отношение эффектора к клеткам мишеням (таргетные), Э:Т) в функциональных T-клетках BsCAR. T-клетки BsCAR эффективно индуцировали гибель клеток BT-474 в присутствии переключателей 9.29-барназы или G3-барназы; $IC_{50} = 0,1 \pm 0,06$ и $0,2 \pm 0,1$ нМ соответственно (Рисунок 34Б).

Цитотоксичность более 50% наблюдалась с отношения BsCAR-T к ВТ-474, равного 10, в присутствии 1 нМ дарпин-барназы (Рисунок 34В). Также была обнаружена секреция провоспалительных цитокинов Т-клетками BsCAR в присутствии молекул-посредников: $EC_{50} = 0,2 \pm 0,1$ нМ для ИФН- γ (Рисунок 34Г) и $EC_{50} = 0,6 \pm 0,1$ нМ для ИЛ-2 (Рисунок 34Д).

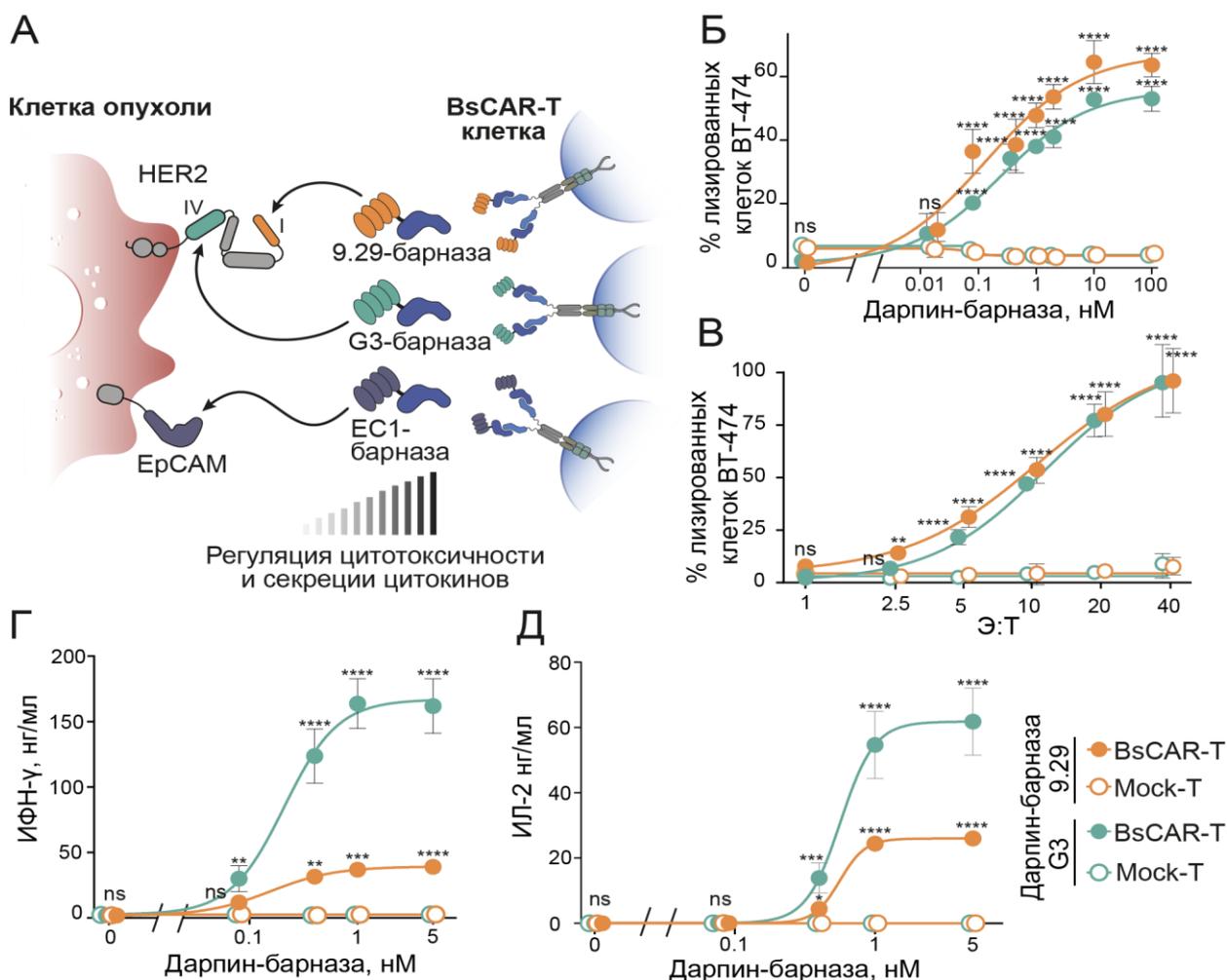


Рисунок 34 – Активация Т-клеток BsCAR и лизис клеток-мишеней ВТ-474 *in vitro* зависит от концентрации дарпин-барназы. А) Специфическое связывание через молекулу-посредник опосредует дозозависимое распознавание и нацеливание Т-клеток BsCAR на опухолевые клетки. 9.29-барназа и G3-барназа направляют BsCAR Т-клетки к дистальным и проксимальным к мембране внеклеточным доменам опухолевого антигена HER2 соответственно. ЕС1-барназа направляет Т-клетки BsCAR против ЕрСАМ-позитивных клеток. Б) Клетки ВТ-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 ВТ-474 с помощью BsCAR-T и Mock-T-клеток в присутствии 1 нМ

9.29-барназы или G3-барназы. Г, Д) Клетки ВТ-474 инкубировали с Т-клетками BsCAR и различными концентрациями 9.29-барназы или G3-барназы, чтобы оценить секрецию ИФН- γ (Г) и ИЛ-2 (Д) (соотношение Э:Т – 10:1; n=4). 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

Цитотоксичность переключаемых Т-клеток BsCAR была сравнима с Т-клетками, модифицированными конструкцией scFv4D5 HER2-CAR [246] (Рисунок 35).

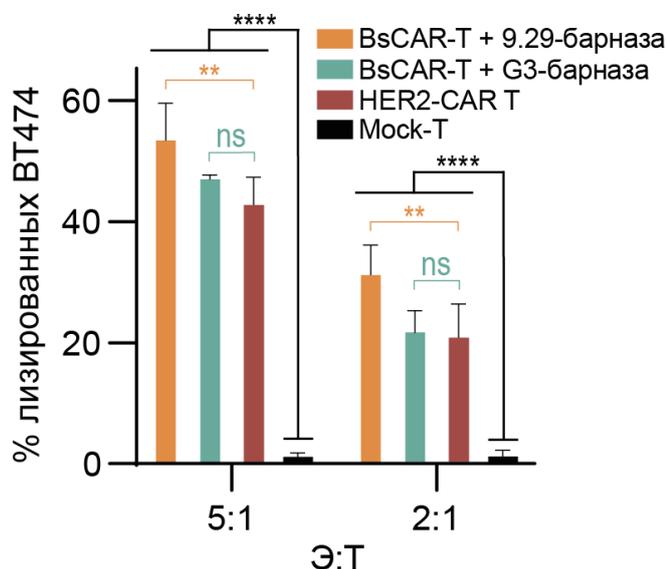


Рисунок 35 – Сравнение цитотоксичности модульных BsCAR и анти-HER2-CAR Т-клеток. Клетки ВТ-474 совместно инкубировали с анти-HER2-CAR (scFv 4D5) Т-клетками или BsCAR Т-клетками с 1 нМ дарпин 9.29-барназой или G3-барназой (соотношение эффектор:опухолевые клетки – 5:1 и 2:1) (n=4). Mock Т-клетки использовали в качестве отрицательного контроля. Данные проанализированы с помощью двустороннего дисперсионного анализа с множественными сравнениями Сидака и представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Статистическая значимость: **p<0,01, ****p<0,0001

Модульная система позволяет перенаправлять Т-клетки BsCAR на другие опухолевые антигены (Рисунок 34А). Для демонстрации переключения антигена для Т-клетки BsCAR была разработана молекула-посредник – дарпин EC1-барназа, на основе дарпина EC1 анти ТАА ЕрСАМ [227] (Рисунок 36). Т-клетки

BsCAR эффективно лизировали ЕрСАМ-положительные клетки BT-474 в присутствии ЕС1-барназы: $IC_{50}=0,3 \pm 0,2$ нМ (Рисунок 37).

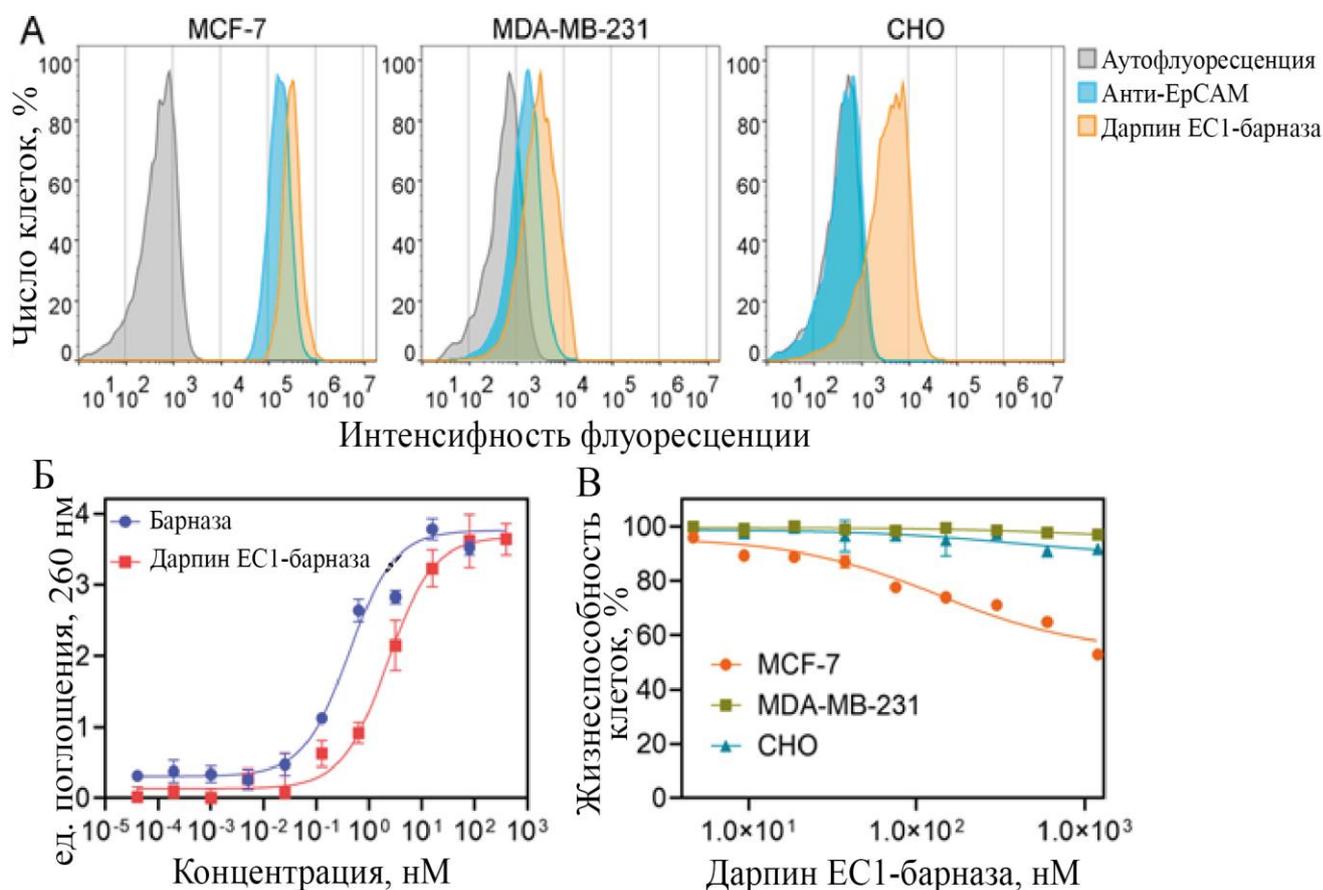


Рисунок 36 – Функциональная активность модуля против ЕрСАМ.

А) Анализ эффективности связывания белков-мишеней со сверхэкспрессирующими клетками ЕрСАМ: антитела анти человеческого CD326, конъюгированного с APC, и дарпин ЕС1-барназа, конъюгированный с DyLight 650. Трастузумаб-FITC, 9.29-барназа-FITC и G3-барназа-FITC анализ на проточной цитометрии. Гистограммы соответствуют распределению интенсивности флуоресценции немеченых (аутофлуоресценция) и меченых клеточных популяций для клеток MCF-7 со сверхэкспрессией ЕрСАМ, клеток MDA-MB-231 с нормальной экспрессией ЕрСАМ и ЕрСАМ-негативных клеток СНО. Б) Ферментативная активность дарпинов ЕС1-барназы и барназы. Оптическая плотность, соответствующая концентрации свободных мононуклеотидов и пропорциональная РНКазной активности образцов, измерялась при $\lambda = 260$ нм. В) Модуль дарпин ЕС1-барназа опосредует специфическую цитотоксичность после продолжительной инкубации с ЕрСАМ-положительными клетками. Анализ проведен с помощью резазурина жизнеспособности клеток MCF-7, MDA-MB-231 и СНО, обработанных дарпин ЕС1-барназой, после 10-ти дней инкубации. Данные представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение

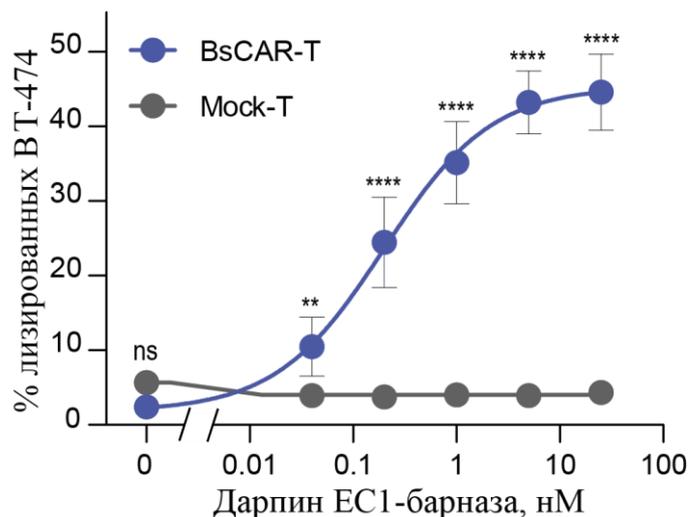


Рисунок 37 – Дарпин EC1-барназа индуцирует Т-клетки BsCAR для элиминации ЕрСАМ-позитивных опухолевых клеток. Клетки ВТ-474, экспрессирующие ЕрСАМ, совместно инкубировали с Т-клетками BsCAR с различными концентрациями дарпин EC1-барназы (соотношение Т-клетки:опухолевые клетки – 10:1) и анализировали на лизис опухолевых клеток путем высвобождения ЛДГ через 10 ч (n=3). Данные проанализированы с помощью двустороннего дисперсионного анализа с множественными сравнениями Сидака и представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Статистическая значимость: **p < 0,01, ****p < 0,0001

Изучение цитотоксических эффектов *in vitro* является важным этапом в разработке нового типа модульной системы. Однако, для адекватной оценки противоопухолевых эффектов обязательным условием является проведение экспериментов на ксенотрансплантантной мышинной модели *in vivo*.

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

Эффективность модульной иммунотерапии Т-клеток BsCAR была продемонстрирована на наиболее трудно поддающихся лечению опухолях – солидных опухолях молочной железы со сверхэкспрессией HER2 на иммунодефицитных NSG мышах. Для удобного прижизненного мониторинга терапии *in vivo* были получены клетки ВТ-474, стабильно экспрессирующие люциферазу FLuc, с помощью трансдукции бицистронным вектором, где под

первым CMV промотором стоит люцифераза, а под вторым – ген устойчивости к гигромицину. Клетки BT-474 FLuc были подкожно инокулированы в правый бок мышей NSG для образования солидных опухолей. Животные случайным образом были разделены на 3 группы (n = 6). Внутривенно через хвостовую вену им были введены:

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

10 млн CAR-Т вводили один раз, а дарпин-барназу вводили тремя сериями по три независимых инъекции в дозах 5, 50 и 500 нМ на килограмм животного, как показано на схеме лечения (Рисунок 38А). Протокол повышения дозы дарпин-барназы применялся для защиты от цитокинового шторма [247] и улучшения персистенции CAR Т-клеток, а также для отсрочки истощения модифицированных Т-клеток [248].

Для оценки эффективности терапии каждые десять дней мышей визуализировали путем анализа люминесценции в области опухоли. Для этого субстрат люциферазы – D-люциферин, вводили внутривенно и через 5 мин после инъекции анализировали люминесценцию. Измерение опухоли проводили штангенциркулем.

Прижизненная визуализация животных продемонстрировала многообещающий терапевтический потенциал Т-клеток BsCAR, управляемых дарпин-барназой, против протоковой карциномы молочной железы (Рисунок 38Б-Г). Рост опухоли ингибировался комбинацией Т-клеток BsCAR и дарпин-барназы (Рисунок 38Г). Опухоль элиминировалась после второго цикла введения 9.29-барназы (Рисунок 38А-Г). Дарпин G3-барназа, который связывается с проксимальным мембранным доменом HER2, не полностью подавлял рост опухоли (Рисунок 38Б-Г). Заранее была проведена контрольная монотерапия с циклами повышения дозы 9.29-барназы или инфузия только Т-клеток BsCAR (Рисунок 39). Такая терапия не подавляла рост опухоли *in vivo*. Инфильтрация Т-

клеток CD8 в опухоль наблюдалась только у животных, которым вводили комбинацию Т-клеток BsCAR и 9.29-барназу или G3-барназу (Рисунок 38Д). Инфильтрирующие опухоль Т-клетки BsCAR составляли ~ 18% от общего количества клеток в опухолях из группы, получавшей 9.29-барназу (Рисунок 40).

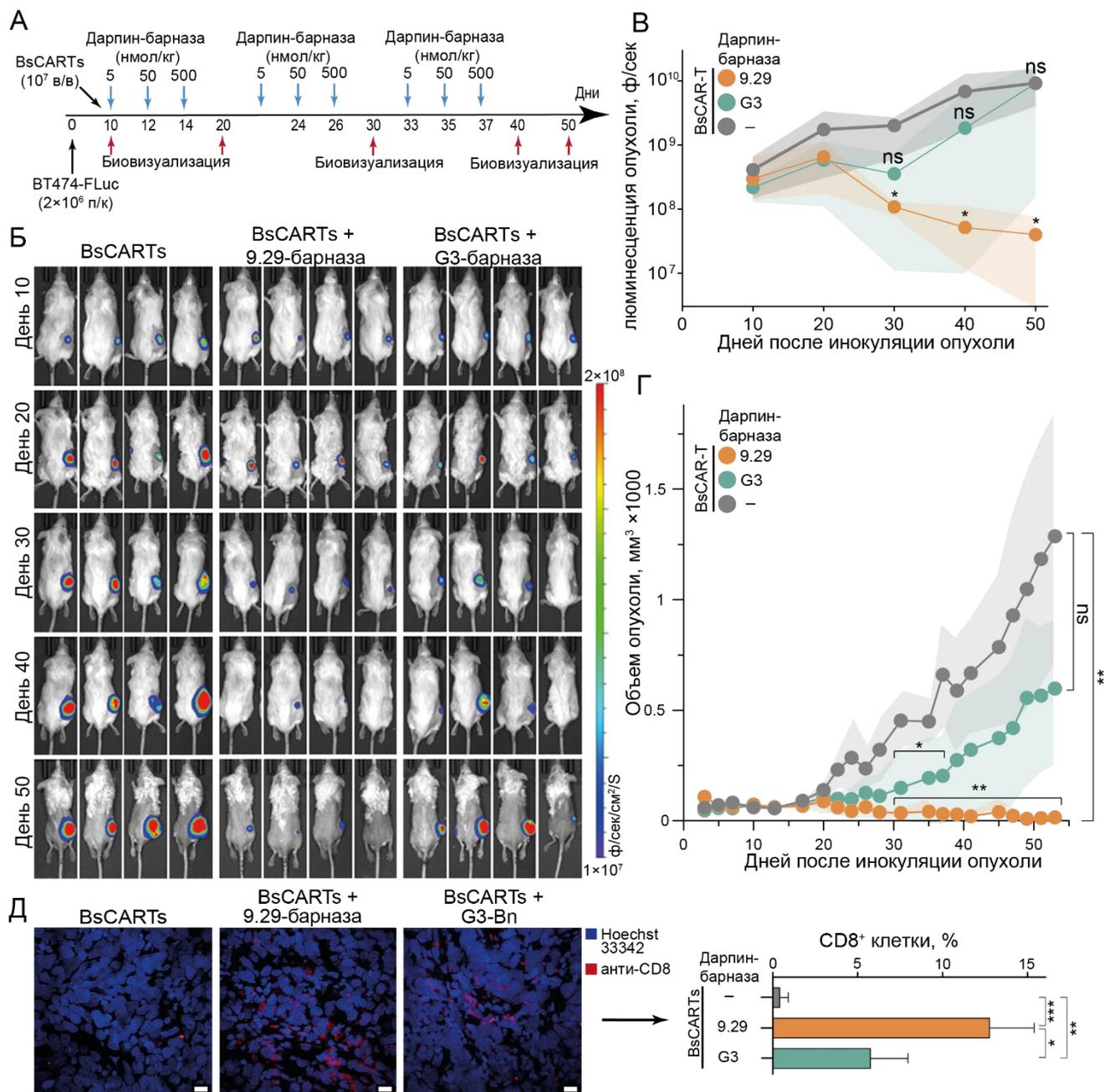


Рисунок 38 –BsCAR Т-клетки в комплексе с молекулой-посредником подавляют HER2-положительные опухоли *in vivo*. А) Схема лечения, основанная на комбинации BsCAR Т-клеток и дарпин-барназы. Мышам NSG имплантировали подкожно 2×10^6 клеток BT-474 FLuc. Через 10 дней после инокуляции опухоли вводили внутривенно 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 мышей на IVIS, получавших Т-клетки BsCAR отдельно или в сочетании с 9.29-барназой и G3-барназой. Представлена биоллюминесценция опухолей отдельных мышей в каждой группе. В) Опухолевая нагрузка, оцененная количественно как среднее значение яркости по активности люциферазы 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. Д) Репрезентативные иммуногистохимические изображения срезов опухоли, окрашенные антителами к человеческому CD8 (красный) и Hoechst 33342 (синий). Масштабная линейка, 20 мкм. Процент CD8-позитивных клеток определяли в 5 окрашенных срезах трех биологических повторов в каждой группе и анализировали с помощью одностороннего ANOVA с t-критерием множественного сравнения Тьюки (n = 3). Статистическая значимость: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение

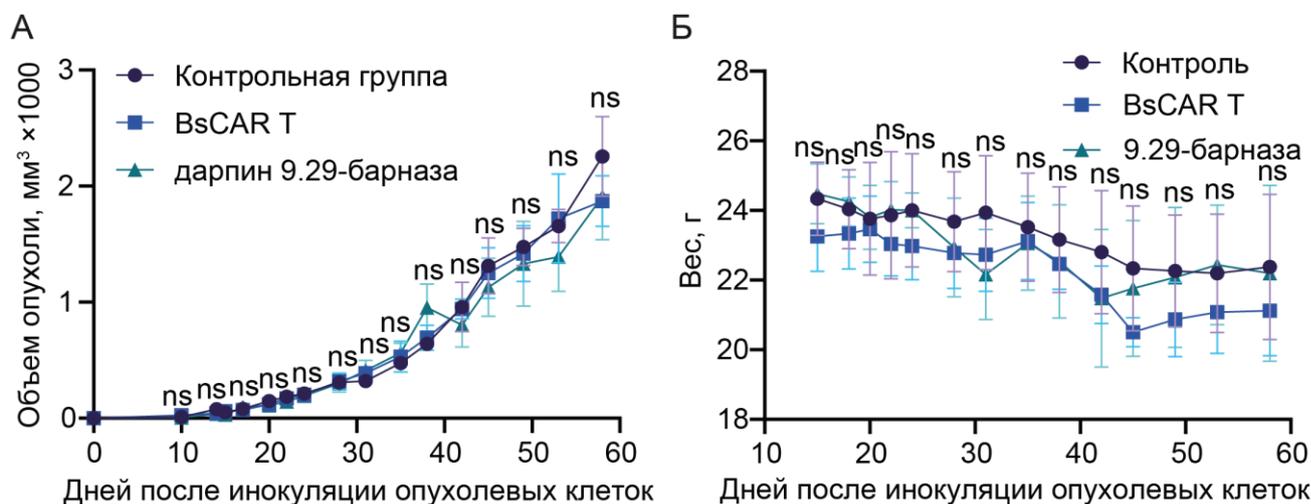


Рисунок 39 – Монотерапия BsCAR-T-клетками или дарпин 9.29-барназой не подавляет рост опухоли *in vivo*. А) Кинетика роста опухоли. Б) Вес мышей из группы контроля и групп, получавших BsCAR-T или дарпин 9.29-барназу (n = 6). Данные проанализированы с помощью критерия Манна-Уитни и представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Различий между группами обнаружено не было

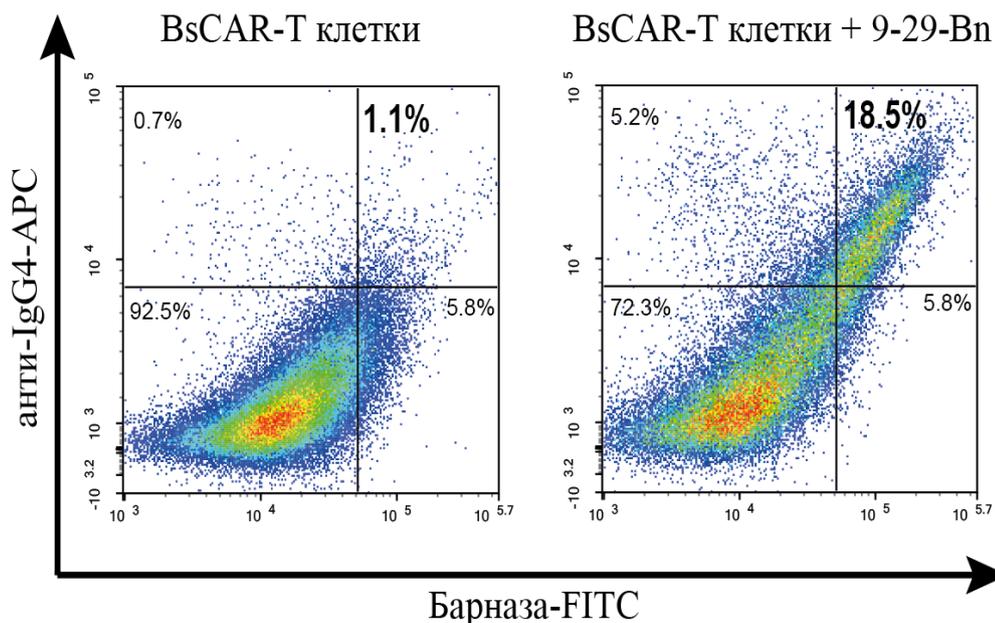


Рисунок 40 – Дарпин 9.29-барназа направляет BsCAR T-клетки в опухоль. Суспензию из одиночных клеток окрашивали антителами анти IgG4-APC и барназой, меченой FITC (барназа-FITC) для обнаружения BsCAR. Анализ проведен с помощью флуоресцентной проточной цитометрии

Таким образом, разработанные переключатели G3-барназа и 9.29-барназа демонстрируют специфическое связывание с рецептором HER2 на поверхности опухолевых клеток. Дарпин-барназа проявляет выраженную рибонуклеазную активность, приводящую к дозозависимой гибели HER2-положительных опухолевых клеток. В отличие от существующих модульных систем, основанных на нековалентных взаимодействиях, барназа и барстар не имеют эндогенных ингибиторов или неспецифических мишеней у млекопитающих. Белок барназа может быть легко слит генетически с любым искусственным каркасом, способным распознавать опухолевые антигены, что делает его универсальным модулем [249].

Панель конструкций BsCAR была разработана для оптимизации их взаимодействия с молекулой-посредником – дарпин-барназой. Был выбран BsCARv4, содержащий замены C40A и C82A, и более длинный линкер Gly-Ser, поскольку он имел высокую поверхностную экспрессию, максимальное взаимодействие с барназой и высокую цитотоксичность. Дарпин-барназа

специфически направляет BsCAR T-клетки человека, вызывая гибель HER2-положительных опухолевых клеток дозозависимым образом. Следовательно, отмена введения молекул-посредников или введение свободной барназы или барстара может быстро отменить терапию T-клетками с BsCAR, что можно использовать для предотвращения серьезных побочных эффектов (Рисунок 28). Другой вариант переключаемой BsCAR-T-клеточной терапии был продемонстрирован в перенацеливании BsCAR T-клеток с HER2 на опухолевый антиген EpCAM путем замены дарпин 9.29-барназы на дарпин EC1-барназу. Важно признать потенциальные ограничения иммуногенности многих модульных CAR. Бактериальное происхождение барназы и барстара означает, что они потенциально иммуногенны и поэтому могут подавляться иммунной системой пациента. Однако, для некоторых бактериальных РНКаз (биназы, РНКазы Sa) показана низкая иммуногенность [250–252]. В недавно опубликованной научной работе было проведено исследование иммуногенности барназы и барстара. Его результаты показали, что введение исследуемых белков не несет серьезных рисков, связанных со специфическим В-клеточным иммунным ответом [253]. С другой стороны, в ряде других работ барназа и барстар применяются в ДНК-вакцинах в качестве димеризирующего компонента для получения мультивалентных вакцин [254,255]. Однако иммуногенность барназы и барстара в этих работах не изучалась. Тем не менее, это не отменяет дальнейшие исследования фармакокинетики и иммуногенности молекул-посредников на основе дарпин-барназы в контексте технологии с BsCAR-T клетками. На основании этих результатов мы считаем, что новые модульные T-клетки с BsCAR, управляемые персонализированными наборами молекул-посредников на основе дарпин-барназы, могут помочь в достижении контролируемой эрадикации солидных опухолей путем одновременного нацеливания на несколько опухолевых антигенов.

5 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 элиминируют опухолевые клетки как *ex vivo*, так и *in vivo* с одинаковой эффективностью по сравнению с CAR, 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 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 PEVL позволяет преодолеть иммуносупрессивное действие опухолевых клеток с повышенной экспрессией PD-L1. Показано, что эффект полного отсутствия PD-1 на поверхности модифицированных CAR-T 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 для трансляционной медицины.

6 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В представленной работе применены следующие сокращения и обозначения:

AICD (activation-induced cell death) – индуцированная активацией смерть клетки, вызванная Fas Fas взаимодействием;

CAR (Chimeric antigen receptor) – химерный антигенный рецептор;

CAR-T – Т-клетки, несущие CAR;

CRES (CAR-related encephalopathy syndrome) – синдром CAR-связанной энцефалопатии;

CRS (cytokine release syndrome) – синдром выброса цитокинов;

DLBCL (diffuse large B-cell lymphoma) – диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, наиболее часто встречающаяся неходжкинская лимфома;

HGBL (high grade B-cell lymphoma) – В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с неблагоприятным прогнозом;

PMBL (primary mediastinal B-cell lymphoma) – первичная крупноклеточная В-клеточная лимфома средостения;

НХЛ – неходжкинские лимфомы (англ. Non-Hodgkin's Lymphoma - NHL);

MCL (mantle cell lymphoma) – неходжкинская лимфома из мантийных клеток лимфотического узла;

ММ – множественная миелома из плазмоцитов;

ХЛЛ – хронический лимфоцитарный лейкоз (chronic lymphocytic leukemia (CLL));

тФЛ – трансформированная фолликулярная лимфома;

ЧОО – частота объективных ответов на терапию.

ГКГ (major histocompatibility complex (MHC)) – главный комплекс гистосовместимости, презентующий процессированный антиген лимфоцитам;

НК – натуральные киллеры;

ИТАМ (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) – иммунорецепторные мотивы активации на основе тирозина;

CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) – рецептор, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CD152), функционирующий как одна из контрольных точек иммунного ответа, ингибируя иммунную реакцию;

PD-1 (programmed cell death 1) – мембранный белок программируемой клеточной смерти (CD279), функционирующий как одна из контрольных точек иммунного ответа;

PD-L1 (programmed cell death 1 ligand 1) – лиганд PD-1;

LAT (linker of activated T cells) – линкер активированных Т-клеток - белок, участвующий в передаче сигнала от Т-клеточного рецептора;

Lck (lymphocyte kinase) – тирозинкиназа, фосфорилирующая белки в Т-лимфоцитах после активации Т-клеточного рецептора;

scFv (single-chain variable fragment) – одноцепочечный вариабельный фрагмент, соединенные между собой линкером вариабельные части тяжелой и легкой цепей антитела;

ТАА (tumor-associated antigen (ТАА)) – опухолеассоциированный антиген;

ТКР (T-cell receptor (TCR)) – Т-клеточный рецептор;

АПК – антигенпрезентирующая клетка;

ИЛ – интерлейкин;

ЛДГ – лактат-дегидрогеназа (LDH);

РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина»;

ТК-ВПГ – тимидинкиназа вируса простого герпеса;

7 БЛАГОДАРНОСТИ

Позвольте выразить огромную благодарность, всем тем, кто принял непосредственное участие в данной диссертационной работы.

Хочется выразить огромную благодарность коллективу лаборатории биокатализа, а также лаборатории молекулярной иммунологии института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) и лаборатории Ричарда Лернера в институте Скриппса в Ла Хойя, США. В особенности, хочу выразить признательность и огромную благодарность – академику, профессору, д.х.н. Александру Габировичу Габирову за предоставленную возможность на базе его лаборатории осуществить данную работу, ценные методические и научные указания, а также научному руководителю к.б.н. Алексею Вячеславовичу Степанову за грамотную, планомерную, аргументированную методическую помощь и наставничество в осуществлении данной работы на всех этапах ее написания, проведения и реализации.

Выражаю глубокую признательность академику, профессору, д.б.н. Сергею Михайловичу Дееву, профессору Ричарду Лернеру, Джиа Кси, д.б.н. Юрию Петровичу Рубцову, к.б.н. Виктории Олеговне Шипуновой, к.б.н. Алексею Анатольевичу Шульге, к.б.н. Ивану Вячеславовичу Черникову, к.б.н. Степану Петровичу Чумакову, к.б.н. Валерии Михайловне Украинской, Василисе Михайловне Терещук, Екатерине Александровне Слуцкой и Дмитрию Васильевичу Волкову за ценные методические советы и помощь в ходе экспериментальной работы. Отдельно хочется поблагодарить дирекцию и администрацию ИБХ РАН за создание благоприятных условий для реализации научного исследования.

8 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. С. 4.
2. Gross G., Waks T., Eshhar Z. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1989. V. 86. № 24. P. 10024–10028.
3. Lee D.W., Kochenderfer J.N., Stetler-Stevenson M., Cui Y.K., Delbrook C., Feldman S.A., Fry T.J., Orentas R., Sabatino M., Shah N.N., et al. // Lancet. 2015. V. 385. № 9967. P. 517–528.
4. Majzner R.G., Mackall C.L. // Nat Med. 2019. V. 25. № 9. P. 1341–1355.
5. Weber E.W., Maus M.V., Mackall C.L. // Cell. 2020. V. 181. № 1. P. 46–62.
6. Porter D.L., Levine B.L., Kalos M., Bagg A., June C.H. // N. Engl. J. Med. 2011. V. 365. № 8. P. 725–733.
7. Porter D.L., Kalos M., Zheng Z., Levine B., June C. // J Cancer. 2011. V. 2. P. 331–332.
8. Kochenderfer J.N., Dudley M.E., Feldman S.A., Wilson W.H., Spaner D.E., Maric I., Stetler-Stevenson M., Phan G.Q., Hughes M.S., Sherry R.M., et al. // Blood. 2012. V. 119. № 12. P. 2709–2720.
9. Brentjens R.J., Davila M.L., Riviere I., Park J., Wang X., Cowell L.G., Bartido S., Stefanski J., Taylor C., Olszewska M., et al. // Sci Transl Med. 2013. V. 5. № 177. P. 177ra38.
10. Grupp S.A., Kalos M., Barrett D., Aplenc R., Porter D.L., Rheingold S.R., Teachey D.T., Chew A., Hauck B., Wright J.F., et al. // N. Engl. J. Med. 2013. V. 368. № 16. P. 1509–1518.
11. Zhao Z., Chen Y., Francisco N.M., Zhang Y., Wu M. // Acta Pharm Sin B. 2018. V. 8. № 4. P. 539–551.
12. Zheng P.-P., Kros J.M., Li J. // Drug Discov Today. 2018. V. 23. № 6. P. 1175–1182.
13. Davila M.L., Riviere I., Wang X., Bartido S., Park J., Curran K., Chung S.S., Stefanski J., Borquez-Ojeda O., Olszewska M., et al. // Sci Transl Med. 2014. V. 6. № 224. P. 224ra25.
14. Schuster S.J., Svoboda J., Chong E.A., Nasta S.D., Mato A.R., Anak Ö., Brogdon J.L., Pruteanu-Malinici I., Bhoj V., Landsburg D., et al. // N Engl J Med. 2017. V. 377. № 26. P. 2545–2554.
15. Neelapu S.S., Locke F.L., Bartlett N.L., Lekakis L.J., Miklos D.B., Jacobson C.A., Braunschweig I., Oluwole O.O., Siddiqi T., Lin Y., et al. // N Engl J Med. 2017. V. 377. № 26. P. 2531–2544.
16. Wang M., Munoz J., Goy A., Locke F.L., Jacobson C.A., Hill B.T., Timmerman J.M., Holmes H., Jaglowski S., Flinn I.W., et al. // N Engl J Med. 2020. V. 382. № 14. P. 1331–1342.

17. Al-Mansour M., Al-Foheidi M., Ibrahim E. // *Mol Clin Oncol*. 2020. V. 13. № 4. P. 33.
18. D'Aloia M.M., Zizzari I.G., Sacchetti B., Pierelli L., Alimandi M. // *Cell Death Dis*. 2018. V. 9. № 3. P. 282.
19. Lamers C.H., Sleijfer S., van Steenbergen S., van Elzakker P., van Krimpen B., Groot C., Vulto A., den Bakker M., Oosterwijk E., Debets R., et al. // *Mol. Ther*. 2013. V. 21. № 4. P. 904–912.
20. Morgan R.A., Yang J.C., Kitano M., Dudley M.E., Laurencot C.M., Rosenberg S.A. // *Mol. Ther*. 2010. V. 18. № 4. P. 843–851.
21. Yi M., Niu M., Xu L., Luo S., Wu K. // *Journal of Hematology & Oncology*. 2021. V. 14. № 1. P. 10.
22. Kalantari Khandani N., Ghahremanloo A., Hashemy S.I. // *Journal of Cellular Physiology*. 2020. V. 235. № 10. P. 6496–6506.
23. Rupp L.J., Schumann K., Roybal K.T., Gate R.E., Ye C.J., Lim W.A., Marson A. // *Sci Rep*. 2017. V. 7. № 1. P. 737.
24. John L.B., Kershaw M.H., Darcy P.K. // *Oncoimmunology*. 2013. V. 2. № 10. P. e26286.
25. Kwok G., Yau T.C.C., Chiu J.W., Tse E., Kwong Y.-L. // *Hum Vaccin Immunother*. 2016. V. 12. № 11. P. 2777–2789.
26. Suarez E.R., Chang D.K., Sun J., Sui J., Freeman G.J., Signoretti S., Zhu Q., Marasco W.A. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 23. P. 34341–34355.
27. Rafiq S., Yeku O.O., Jackson H.J., Purdon T.J., van Leeuwen D.G., Drakes D.J., Song M., Miele M.M., Li Z., Wang P., et al. // *Nat Biotechnol*. 2018. V. 36. № 9. P. 847–856.
28. Ramos C.A., Dotti G. // *Expert Opin Biol Ther*. 2011. V. 11. № 7. P. 855–873.
29. Kalinin R.S., Petukhov A.V., Knorre V.D., Maschan M.A., Stepanov A.V., Gabibov A.G. // *Acta Naturae*. 2018. V. 10. № 2. P. 16–23.
30. Wang J., Mou N., Yang Z., Li Q., Jiang Y., Meng J., Liu X., Deng Q. // *Br J Haematol*. 2020.
31. Yang F., Zhang J., Zhang X., Tian M., Wang J., Kang L., Qiu H., Wu D. // *Onco Targets Ther*. 2019. V. 12. P. 2187–2191.
32. Long A.H., Haso W.M., Shern J.F., Wanhainen K.M., Murgai M., Ingaramo M., Smith J.P., Walker A.J., Kohler M.E., Venkateshwara V.R., et al. // *Nat Med*. 2015. V. 21. № 6. P. 581–590.
33. Gomes-Silva D., Mukherjee M., Srinivasan M., Krenciute G., Dakhova O., Zheng Y., Cabral J.M.S., Rooney C.M., Orange J.S., Brenner M.K., et al. // *Cell Rep*. 2017. V. 21. № 1. P. 17–26.
34. Hu S., Marshall C., Darby J., Wei W., Lyons A.B., Körner H. // *Front Immunol*. 2018. V. 9. P. 1.
35. Ajina A., Maher J. // *Mol Cancer Ther*. 2018. V. 17. № 9. P. 1795–1815.
36. Stepanov A.V., Markov O.V., Chernikov I.V., Gladkikh D.V., Zhang H., Jones T., Sen'kova A.V., Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A., Kalinin R.S., et al. // *Sci Adv*. 2018. V. 4. № 11. P. eaau4580.

37. Xie Y.J., Dougan M., Jaiikhani N., Ingram J., Fang T., Kummer L., Momin N., Pishesha N., Rickelt S., Hynes R.O., et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019. V. 116. № 16. P. 7624–7631.
38. Kahlon K.S., Brown C., Cooper L.J.N., Raubitschek A., Forman S.J., Jensen M.C. // *Cancer Res*. 2004. V. 64. № 24. P. 9160–9166.
39. Brown C.E., Aguilar B., Starr R., Yang X., Chang W.-C., Weng L., Chang B., Sarkissian A., Brito A., Sanchez J.F., et al. // *Mol Ther*. 2018. V. 26. № 1. P. 31–44.
40. Sentman C.L., Meehan K.R. // *Cancer J*. 2014. V. 20. № 2. P. 156–159.
41. Grönwall C., Ståhl S. // *J. Biotechnol*. 2009. V. 140. № 3–4. P. 254–269.
42. Petrovskaia L.E., Shingarova L.N., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // *Bioorg. Khim*. 2011. V. 37. № 5. P. 581–591.
43. Koch H., Gräfe N., Schiess R., Plückthun A. // *J. Mol. Biol*. 2006. V. 357. № 2. P. 427–441.
44. Zhang H., Sturchler E., Zhu J., Nieto A., Cistrone P.A., Xie J., He L., Yea K., Jones T., Turn R., et al. // *Nat Commun*. 2015. V. 6. P. 8918.
45. Xie J., Zhang H., Yea K., Lerner R.A. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013. V. 110. № 20. P. 8099–8104.
46. Srivastava S., Riddell S.R. // *Trends Immunol*. 2015. V. 36. № 8. P. 494–502.
47. Benmebarek M.-R., Karches C.H., Cadilha B.L., Lesch S., Endres S., Kobold S. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. V. 20. № 6. .
48. Chang Z.L., Chen Y.Y. // *Trends Mol Med*. 2017. V. 23. № 5. P. 430–450.
49. James S.E., Greenberg P.D., Jensen M.C., Lin Y., Wang J., Till B.G., Raubitschek A.A., Forman S.J., Press O.W. // *J Immunol*. 2008. V. 180. № 10. P. 7028–7038.
50. Hudecek M., Lupo-Stanghellini M.-T., Kosasih P.L., Sommermeyer D., Jensen M.C., Rader C., Riddell S.R. // *Clin Cancer Res*. 2013. V. 19. № 12. P. 3153–3164.
51. Guest R.D., Hawkins R.E., Kirillova N., Cheadle E.J., Arnold J., O'Neill A., Irlam J., Chester K.A., Kemshead J.T., Shaw D.M., et al. // *J. Immunother*. 2005. V. 28. № 3. P. 203–211.
52. Hombach A., Heuser C., Gerken M., Fischer B., Lewalter K., Diehl V., Pohl C., Abken H. // *Gene Ther*. 2000. V. 7. № 12. P. 1067–1075.
53. Wilkie S., Picco G., Foster J., Davies D.M., Julien S., Cooper L., Arif S., Mather S.J., Taylor-Papadimitriou J., Burchell J.M., et al. // *The Journal of Immunology*. 2008. V. 180. № 7. P. 4901–4909.
54. Jonnalagadda M., Mardiros A., Urak R., Wang X., Hoffman L.J., Bernanke A., Chang W.-C., Bretzlaff W., Starr R., Priceman S., et al. // *Mol Ther*. 2015. V. 23. № 4. P. 757–768.
55. Hombach A., Hombach A.A., Abken H. // *Gene Ther*. 2010. V. 17. № 10. P. 1206–1213.
56. Almåsbak H., Walseng E., Kristian A., Myhre M.R., Suso E.M., Munthe L.A., Andersen J.T., Wang M.Y., Kvalheim G., Gaudernack G., et al. // *Gene Ther*. 2015. V. 22. № 5. P. 391–403.

57. Hudecek M., Sommermeyer D., Kosasih P.L., Silva-Benedict A., Liu L., Rader C., Jensen M.C., Riddell S.R. // *Cancer Immunol Res.* 2015. V. 3. № 2. P. 125–135.
58. Ying Z., Huang X.F., Xiang X., Liu Y., Kang X., Song Y., Guo X., Liu H., Ding N., Zhang T., et al. // *Nat Med.* 2019. V. 25. № 6. P. 947–953.
59. Bettini M.L., Chou P.-C., Guy C.S., Lee T., Vignali K.M., Vignali D.A.A. // *The Journal of Immunology.* 2017. V. 199. № 5. P. 1555–1560.
60. Weinkove R., George P., Dasyam N., McLellan A.D. // *Clin Transl Immunology.* 2019. V. 8. № 5. P. e1049.
61. Zhang C., Liu J., Zhong J.F., Zhang X. // *Biomark Res.* 2017. V. 5. P. 22.
62. Tokarew N., Ogonek J., Endres S., von Bergwelt-Baildon M., Kobold S. // *Br J Cancer.* 2019. V. 120. № 1. P. 26–37.
63. Eshhar Z., Waks T., Gross G., Schindler D.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993. V. 90. № 2. P. 720–724.
64. Sadelain M., Brentjens R., Rivière I. // *Current Opinion in Immunology.* 2009. V. 21. № 2. P. 215–223.
65. Kershaw M.H., Westwood J.A., Parker L.L., Wang G., Eshhar Z., Mavroukakis S.A., White D.E., Wunderlich J.R., Canevari S., Rogers-Freezer L., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2006. V. 12. № 20 Pt 1. P. 6106–6115.
66. Lamers C.H.J., Langeveld S.C.L., Groot-van Ruijven C.M., Debets R., Sleijfer S., Gratama J.W. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2007. V. 56. № 12. P. 1875–1883.
67. Park J.R., Digiusto D.L., Slovak M., Wright C., Naranjo A., Wagner J., Meechoovet H.B., Bautista C., Chang W.-C., Ostberg J.R., et al. // *Mol Ther.* 2007. V. 15. № 4. P. 825–833.
68. Pule M.A., Savoldo B., Myers G.D., Rossig C., Russell H.V., Dotti G., Huls M.H., Liu E., Gee A.P., Mei Z., et al. // *Nat. Med.* 2008. V. 14. № 11. P. 1264–1270.
69. Till B.G., Jensen M.C., Wang J., Chen E.Y., Wood B.L., Greisman H.A., Qian X., James S.E., Raubitschek A., Forman S.J., et al. // *Blood.* 2008. V. 112. № 6. P. 2261–2271.
70. Bridgeman J.S., Hawkins R.E., Bagley S., Blaylock M., Holland M., Gilham D.E. // *J Immunol.* 2010. V. 184. № 12. P. 6938–6949.
71. Sadelain M., Brentjens R., Rivière I. // *Cancer Discov.* 2013. V. 3. № 4. P. 388–398.
72. Dotti G., Savoldo B., Brenner M. // *Hum. Gene Ther.* 2009. V. 20. № 11. P. 1229–1239.
73. Finney H.M., Akbar A.N., Lawson A.D.G. // *J. Immunol.* 2004. V. 172. № 1. P. 104–113.
74. Kawalekar O.U., O'Connor R.S., Fraietta J.A., Guo L., McGettigan S.E., Posey A.D., Patel P.R., Guedan S., Scholler J., Keith B., et al. // *Immunity.* 2016. V. 44. № 2. P. 380–390.
75. Porter D.L., Hwang W.-T., Frey N.V., Lacey S.F., Shaw P.A., Loren A.W., Bagg A., Marcucci K.T., Shen A., Gonzalez V., et al. // *Sci Transl Med.* 2015. V. 7. № 303. P. 303ra139.

76. Fraietta J.A., Lacey S.F., Orlando E.J., Pruteanu-Malinici I., Gohil M., Lundh S., Boesteanu A.C., Wang Y., O'Connor R.S., Hwang W.-T., et al. // *Nat Med.* 2018. V. 24. № 5. P. 563–571.
77. Salter A.I., Ivey R.G., Kennedy J.J., Voillet V., Rajan A., Alderman E.J., Voytovich U.J., Lin C., Sommermeyer D., Liu L., et al. // *Sci Signal.* 2018. V. 11. № 544. P. eaat6753.
78. Quintarelli C., Orlando D., Boffa I., Guercio M., Polito V.A., Petretto A., Lavarello C., Sinibaldi M., Weber G., Del Bufalo F., et al. // *Oncoimmunology.* 2018. V. 7. № 6.
79. Watts T.H. // *Annu Rev Immunol.* 2005. V. 23. P. 23–68.
80. Boomer J.S., Green J.M. // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010. V. 2. № 8. P. a002436.
81. Xiong W., Chen Y., Kang X., Chen Z., Zheng P., Hsu Y.-H., Jang J.H., Qin L., Liu H., Dotti G., et al. // *Molecular Therapy.* 2018. V. 26. № 4. P. 963–975.
82. Maher J., Brentjens R.J., Gunset G., Rivière I., Sadelain M. // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. № 1. P. 70–75.
83. Cai B., Guo M., Wang Y., Zhang Y., Yang J., Guo Y., Dai H., Yu C., Sun Q., Qiao J., et al. // *J Hematol Oncol.* 2016. V. 9. P. 131.
84. Hu Y., Sun J., Wu Z., Yu J., Cui Q., Pu C., Liang B., Luo Y., Shi J., Jin A., et al. // *J Hematol Oncol.* 2016. V. 9. № 1. P. 70.
85. Marin V., Pizzitola I., Agostoni V., Attianese G.M.P.G., Finney H., Lawson A., Pule M., Rousseau R., Biondi A., Biagi E. // *Haematologica.* 2010. V. 95. № 12. P. 2144–2152.
86. Savoldo B., Ramos C.A., Liu E., Mims M.P., Keating M.J., Carrum G., Kamble R.T., Bollard C.M., Gee A.P., Mei Z., et al. // *J. Clin. Invest.* 2011. V. 121. № 5. P. 1822–1826.
87. Karlsson H., Svensson E., Gigg C., Jarvius M., Olsson-Strömberg U., Savoldo B., Dotti G., Loskog A. // *PLOS ONE.* 2015. V. 10. № 12. P. e0144787.
88. Zhong X.-S., Matsushita M., Plotkin J., Riviere I., Sadelain M. // *Mol. Ther.* 2010. V. 18. № 2. P. 413–420.
89. Carpenito C., Milone M.C., Hassan R., Simonet J.C., Lakhali M., Suhoski M.M., Varela-Rohena A., Haines K.M., Heitjan D.F., Albelda S.M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009. V. 106. № 9. P. 3360–3365.
90. Guedan S., Posey A.D., Shaw C., Wing A., Da T., Patel P.R., McGettigan S.E., Casado-Medrano V., Kawalekar O.U., Uribe-Herranz M., et al. // *JCI Insight.* V. 3. № 1. P. e96976.
91. Frankel S.R., Baeuerle P.A. // *Curr Opin Chem Biol.* 2013. V. 17. № 3. P. 385–392.
92. Till B.G., Jensen M.C., Wang J., Qian X., Gopal A.K., Maloney D.G., Lindgren C.G., Lin Y., Pagel J.M., Budde L.E., et al. // *Blood.* 2012. V. 119. № 17. P. 3940–3950.
93. Pulè M.A., Straathof K.C., Dotti G., Heslop H.E., Rooney C.M., Brenner M.K. // *Mol. Ther.* 2005. V. 12. № 5. P. 933–941.

94. Heczey A., Louis C.U., Savoldo B., Dakhova O., Durett A., Grilley B., Liu H., Wu M.F., Mei Z., Gee A., et al. // *Molecular Therapy*. 2017. V. 25. № 9. P. 2214–2224.
95. Louis C.U., Savoldo B., Dotti G., Pule M., Yvon E., Myers G.D., Rossig C., Russell H.V., Diouf O., Liu E., et al. // *Blood*. 2011. V. 118. № 23. P. 6050–6056.
96. Huang R., Li X., He Y., Zhu W., Gao L., Liu Y., Gao L., Wen Q., Zhong J.F., Zhang C., et al. // *J Hematol Oncol*. 2020. V. 13.
97. Colombo M.P., Trinchieri G. // *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002. V. 13. № 2. P. 155–168.
98. Ataca Atilla P., Tashiro H., McKenna M.K., Srinivasan M., Simons B.W., Stevens A.M., Redell M., Mamonkin M., Brenner M.K., Atilla E. // *Blood*. 2019. V. 134. № Supplement_1. P. 3912–3912.
99. Chinnasamy D., Yu Z., Kerkar S.P., Zhang L., Morgan R.A., Restifo N.P., Rosenberg S.A. // *Clin Cancer Res*. 2012. V. 18. № 6. P. 1672–1683.
100. Koneru M., Purdon T.J., Spriggs D., Koneru S., Brentjens R.J. // *Oncoimmunology*. 2015. V. 4. № 3. P. e994446.
101. Yeku O.O., Purdon T.J., Koneru M., Spriggs D., Brentjens R.J. // *Sci Rep*. 2017. V. 7.
102. You F., Jiang L., Zhang B., Lu Q., Zhou Q., Liao X., Wu H., Du K., Zhu Y., Meng H., et al. // *Sci China Life Sci*. 2016. V. 59. № 4. P. 386–397.
103. Chen Y., Sun C., Landoni E., Metelitsa L., Dotti G., Savoldo B. // *Clin Cancer Res*. 2019. V. 25. № 9. P. 2915–2924.
104. Chmielewski M., Abken H. // *Expert Opin Biol Ther*. 2015. V. 15. № 8. P. 1145–1154.
105. Gattinoni L., Klebanoff C.A., Palmer D.C., Wrzesinski C., Kerstann K., Yu Z., Finkelstein S.E., Theoret M.R., Rosenberg S.A., Restifo N.P. // *J Clin Invest*. 2005. V. 115. № 6. P. 1616–1626.
106. Song D.-G., Ye Q., Carpenito C., Poussin M., Wang L.-P., Ji C., Figini M., June C.H., Coukos G., Powell D.J. // *Cancer Res*. 2011. V. 71. № 13. P. 4617–4627.
107. Corse E., Gottschalk R.A., Allison J.P. // *The Journal of Immunology*. 2011. V. 186. № 9. P. 5039–5045.
108. van Panhuys N. // *Frontiers in Immunology*. 2016. V. 7. P. 6.
109. Harris D.T., Kranz D.M. // *Trends Pharmacol. Sci*. 2016. V. 37. № 3. P. 220–230.
110. Li G., Boucher J.C., Kotani H., Park K., Zhang Y., Shrestha B., Wang X., Guan L., Beatty N., Abate-Daga D., et al. // *JCI Insight*. 2018. V. 3. № 18. P. 121322.
111. Lindner S.E., Johnson S.M., Brown C.E., Wang L.D. // *Science Advances*. 2020.
112. Brentjens R.J., Santos E., Nikhamin Y., Yeh R., Matsushita M., La Perle K., Quintás-Cardama A., Larson S.M., Sadelain M. // *Clin Cancer Res*. 2007. V. 13. № 18 Pt 1. P. 5426–5435.
113. Stinchcombe J.C., Bossi G., Booth S., Griffiths G.M. // *Immunity*. 2001. V. 15. № 5. P. 751–761.
114. Purbhoo M.A., Irvine D.J., Huppa J.B., Davis M.M. // *Nat Immunol*. 2004. V. 5. № 5. P. 524–530.

115. Davenport A.J., Cross R.S., Watson K.A., Liao Y., Shi W., Prince H.M., Beavis P.A., Trapani J.A., Kershaw M.H., Ritchie D.S., et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018. V. 115. № 9. P. E2068–E2076.
116. James J.R., Vale R.D. // *Nature*. 2012. V. 487. № 7405. P. 64–69.
117. Levine B.L. // *Cancer Gene Ther*. 2015. V. 22. № 2. P. 79–84.
118. Jacoby E., Yang Y., Qin H., Chien C.D., Kochenderfer J.N., Fry T.J. // *Blood*. 2016. V. 127. № 10. P. 1361–1370.
119. Kochenderfer J.N., Dudley M.E., Carpenter R.O., Kassim S.H., Rose J.J., Telford W.G., Hakim F.T., Halverson D.C., Fowler D.H., Hardy N.M., et al. // *Blood*. 2013. V. 122. № 25. P. 4129–4139.
120. Anwer F., Shaukat A.-A., Zahid U., Husnain M., McBride A., Persky D., Lim M., Hasan N., Riaz I.B. // *Immunotherapy*. 2017. V. 9. № 2. P. 123–130.
121. Xu Y., Zhang M., Ramos C.A., Durett A., Liu E., Dakhova O., Liu H., Creighton C.J., Gee A.P., Heslop H.E., et al. // *Blood*. 2014. V. 123. № 24. P. 3750–3759.
122. Gargett T., Brown M.P. // *Cytherapy*. 2015. V. 17. № 4. P. 487–495.
123. Yang S., Ji Y., Gattinoni L., Zhang L., Yu Z., Restifo N.P., Rosenberg S.A., Morgan R.A. // *Cancer Immunol. Immunother*. 2013. V. 62. № 4. P. 727–736.
124. Guedan S., Chen X., Madar A., Carpenito C., McGettigan S.E., Frigault M.J., Lee J., Posey A.D., Scholler J., Scholler N., et al. // *Blood*. 2014. V. 124. № 7. P. 1070–1080.
125. Klebanoff C.A., Finkelstein S.E., Surman D.R., Lichtman M.K., Gattinoni L., Theoret M.R., Grewal N., Spiess P.J., Antony P.A., Palmer D.C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004. V. 101. № 7. P. 1969–1974.
126. Przybylowski M., Hakakha A., Stefanski J., Hodges J., Sadelain M., Rivière I. // *Gene Ther*. 2006. V. 13. № 1. P. 95–100.
127. Wang G.P., Garrigue A., Ciuffi A., Ronen K., Leipzig J., Berry C., Lagresle-Peyrou C., Benjelloun F., Hacein-Bey-Abina S., Fischer A., et al. // *Nucleic Acids Res*. 2008. V. 36. № 9. P. e49.
128. McGarrity G.J., Hoyah G., Winemiller A., Andre K., Stein D., Blick G., Greenberg R.N., Kinder C., Zolopa A., Binder-Scholl G., et al. // *J Gene Med*. 2013. V. 15. № 2. P. 78–82.
129. Pahle J., Walther W. // *Expert Opin Biol Ther*. 2016. V. 16. № 4. P. 443–461.
130. Kay M.A., He C.-Y., Chen Z.-Y. // *Nat. Biotechnol*. 2010. V. 28. № 12. P. 1287–1289.
131. Eyquem J., Mansilla-Soto J., Giavridis T., van der Stegen S.J.C., Hamieh M., Cunanan K.M., Odak A., Gönen M., Sadelain M. // *Nature*. 2017. V. 543. № 7643. P. 113–117.
132. Rezvani K., Rouse R., Liu E., Shpall E. // *Mol. Ther*. 2017. V. 25. № 8. P. 1769–1781.
133. Tang X., Yang L., Li Z., Nalin A.P., Dai H., Xu T., Yin J., You F., Zhu M., Shen W., et al. // *Am J Cancer Res*. 2018. V. 8. № 6. P. 1083–1089.

134. Nowakowska P., Romanski A., Miller N., Odendahl M., Bonig H., Zhang C., Seifried E., Wels W.S., Tonn T. // *Cancer Immunol Immunother.* 2018. V. 67. № 1. P. 25–38.
135. Gattinoni L., Finkelstein S.E., Klebanoff C.A., Antony P.A., Palmer D.C., Spiess P.J., Hwang L.N., Yu Z., Wrzesinski C., Heimann D.M., et al. // *J. Exp. Med.* 2005. V. 202. № 7. P. 907–912.
136. Popplewell L., Wang X., Naranjo A., Blanchard S., Wagner J., Wong C., Urak R., Chang W.-C., Khaled S.K., Siddiqi T., et al. // *Blood.* 2015. V. 126. № 23. P. 930–930.
137. Kochenderfer J.N., Wilson W.H., Janik J.E., Dudley M.E., Stetler-Stevenson M., Feldman S.A., Maric I., Raffeld M., Nathan D.-A.N., Lanier B.J., et al. // *Blood.* 2010. V. 116. № 20. P. 4099–4102.
138. Schuster S.J., Svoboda J., Nasta S.D., Porter D.L., Chong E.A., Landsburg D.J., Mato A.R., Lacey S.F., Melenhorst J.J., Chew A., et al. // *Blood.* 2015. V. 126. № 23. P. 183–183.
139. Kochenderfer J.N., Feldman S.A., Zhao Y., Xu H., Black M.A., Morgan R.A., Wilson W.H., Rosenberg S.A. // *J Immunother.* 2009. V. 32. № 7. P. 689–702.
140. Turtle C.J., Hay K.A., Hanafi L.-A., Li D., Cherian S., Chen X., Wood B., Lozanski A., Byrd J.C., Heimfeld S., et al. // *J Clin Oncol.* 2017. V. 35. № 26. P. 3010–3020.
141. Abramson J.S., Gordon L.I., Palomba M.L., Lunning M.A., Arnason J.E., Forero-Torres A., Wang M., Maloney D.G., Sehgal A., Andreadis C., et al. // *JCO.* 2018. V. 36. № 15_suppl. P. 7505–7505.
142. Cho S.-F., Anderson K.C., Tai Y.-T. // *Frontiers in Immunology.* 2018. V. 9. P. 1821.
143. Kalos M., Levine B.L., Porter D.L., Katz S., Grupp S.A., Bagg A., June C.H. // *Sci Transl Med.* 2011. V. 3. № 95. P. 95ra73.
144. Brentjens R.J., Rivière I., Park J.H., Davila M.L., Wang X., Stefanski J., Taylor C., Yeh R., Bartido S., Borquez-Ojeda O., et al. // *Blood.* 2011. V. 118. № 18. P. 4817–4828.
145. Xu X.-J., Zhao H.-Z., Tang Y.-M. // *Leuk. Lymphoma.* 2013. V. 54. № 2. P. 255–260.
146. Akpek G., Lee S.M., Anders V., Vogelsang G.B. // *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2001. V. 7. № 9. P. 495–502.
147. Ferrara F., Mele G., Palmieri S., Pedata M., Copia C., Riccardi C., Izzo T., Criscuolo C., Musto P. // *Hematol Oncol.* 2009. V. 27. № 4. P. 198–202.
148. Johnson L.A., Morgan R.A., Dudley M.E., Cassard L., Yang J.C., Hughes M.S., Kammula U.S., Royal R.E., Sherry R.M., Wunderlich J.R., et al. // *Blood.* 2009. V. 114. № 3. P. 535–546.
149. Xu X., Sun Q., Liang X., Chen Z., Zhang X., Zhou X., Li M., Tu H., Liu Y., Tu S., et al. // *Front Immunol.* 2019. V. 10. P. 2664.
150. Kailayangiri S., Altvater B., Wiebel M., Jamitzky S., Rossig C. // *Cancers (Basel).* 2020. V. 12. № 5. P. 1075.

151. Maude S.L., Laetsch T.W., Buechner J., Rives S., Boyer M., Bittencourt H., Bader P., Verneris M.R., Stefanski H.E., Myers G.D., et al. // *N Engl J Med*. 2018. V. 378. № 5. P. 439–448.
152. Park J.H., Rivière I., Gonen M., Wang X., Sénéchal B., Curran K.J., Sauter C., Wang Y., Santomasso B., Mead E., et al. // *N Engl J Med*. 2018. V. 378. № 5. P. 449–459.
153. Purba E.R., Saita E., Maruyama I.N. // *Cells*. 2017. V. 6. № 2.
154. Huang H.S., Nagane M., Klingbeil C.K., Lin H., Nishikawa R., Ji X.D., Huang C.M., Gill G.N., Wiley H.S., Cavenee W.K. // *J Biol Chem*. 1997. V. 272. № 5. P. 2927–2935.
155. Shtiegman K., Kochupurakkal B.S., Zwang Y., Pines G., Starr A., Vexler A., Citri A., Katz M., Lavi S., Ben-Basat Y., et al. // *Oncogene*. 2007. V. 26. № 49. P. 6968–6978.
156. Mitri Z., Constantine T., O'Regan R. // *Chemother Res Pract*. 2012. V. 2012.
157. Zhang J.G., Kruse C.A., Driggers L., Hoa N., Wisoff J., Allen J.C., Zagzag D., Newcomb E.W., Judus M.R. // *J Neurooncol*. 2008. V. 88. № 1. P. 65–76.
158. Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A., Holt J.A., Wong S.G., Keith D.E., Levin W.J., Stuart S.G., Udove J., Ullrich A. // *Science*. 1989. V. 244. № 4905. P. 707–712.
159. Ogasawara K., Lanier L.L. // *J Clin Immunol*. 2005. V. 25. № 6. P. 534–540.
160. Obeidy P., Sharland A.F. // *Int J Biochem Cell Biol*. 2009. V. 41. № 12. P. 2364–2367.
161. Picarda E., Ohaegbulam K.C., Zang X. // *Clin Cancer Res*. 2016. V. 22. № 14. P. 3425–3431.
162. Inamura K., Yokouchi Y., Kobayashi M., Sakakibara R., Ninomiya H., Subat S., Nagano H., Nomura K., Okumura S., Shibutani T., et al. // *Lung Cancer*. 2017. V. 103. P. 44–51.
163. Seaman S., Zhu Z., Saha S., Zhang X.M., Yang M.Y., Hilton M.B., Morris K., Szot C., Morris H., Swing D.A., et al. // *Cancer Cell*. 2017. V. 31. № 4. P. 501–515.e8.
164. Bhatia R., Gautam S.K., Cannon A., Thompson C., Hall B.R., Aithal A., Banerjee K., Jain M., Solheim J.C., Kumar S., et al. // *Cancer Metastasis Rev*. 2019. V. 38. № 1–2. P. 223–236.
165. Beauchemin N., Arabzadeh A. // *Cancer Metastasis Rev*. 2013. V. 32. № 3–4. P. 643–671.
166. Chaudry M.A., Sales K., Ruf P., Lindhofer H., Winslet M.C. // *Br J Cancer*. 2007. V. 96. № 7. P. 1013–1019.
167. Schaft N. // *Cancers (Basel)*. 2020. V. 12. № 9.
168. Gajewski T.F., Schreiber H., Fu Y.-X. // *Nat Immunol*. 2013. V. 14. № 10. P. 1014–1022.
169. Buchbinder E.I., Desai A. // *Am J Clin Oncol*. 2016. V. 39. № 1. P. 98–106.

170. Lin D.Y.-W., Tanaka Y., Iwasaki M., Gittis A.G., Su H.-P., Mikami B., Okazaki T., Honjo T., Minato N., Garboczi D.N. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. V. 105. № 8. P. 3011–3016.
171. Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. // *Annu Rev Immunol*. 2008. V. 26. P. 677–704.
172. Sheppard K.-A., Fitz L.J., Lee J.M., Benander C., George J.A., Wooters J., Qiu Y., Jussif J.M., Carter L.L., Wood C.R., et al. // *FEBS Lett*. 2004. V. 574. № 1–3. P. 37–41.
173. Pardoll D.M. // *Nat. Rev. Cancer*. 2012. V. 12. № 4. P. 252–264.
174. Topalian S.L., Drake C.G., Pardoll D.M. // *Cancer Cell*. 2015. V. 27. № 4. P. 450–461.
175. Brahmer J.R., Drake C.G., Wollner I., Powderly J.D., Picus J., Sharfman W.H., Stankevich E., Pons A., Salay T.M., McMiller T.L., et al. // *J Clin Oncol*. 2010. V. 28. № 19. P. 3167–3175.
176. Topalian S.L., Sznol M., McDermott D.F., Kluger H.M., Carvajal R.D., Sharfman W.H., Brahmer J.R., Lawrence D.P., Atkins M.B., Powderly J.D., et al. // *J Clin Oncol*. 2014. V. 32. № 10. P. 1020–1030.
177. McDermott D.F., Drake C.G., Sznol M., Choueiri T.K., Powderly J.D., Smith D.C., Brahmer J.R., Carvajal R.D., Hammers H.J., Puzanov I., et al. // *J Clin Oncol*. 2015. V. 33. № 18. P. 2013–2020.
178. Zhang X., Wang C., Wang J., Hu Q., Langworthy B., Ye Y., Sun W., Lin J., Wang T., Fine J., et al. // *Adv Mater*. 2018. V. 30. № 22. P. e1707112.
179. Xie J., Zhou Z., Jiao S., Li X. // *Oncol Lett*. 2018. V. 16. № 1. P. 157–166.
180. Puzanov I., Diab A., Abdallah K., Bingham C.O., Brogdon C., Dadu R., Hamad L., Kim S., Lacouture M.E., LeBoeuf N.R., et al. // *J Immunother Cancer*. 2017. V. 5. № 1. P. 95.
181. Varricchi G., Galdiero M.R., Marone G., Criscuolo G., Triassi M., Bonaduce D., Marone G., Tocchetti C.G. // *ESMO Open*. 2017. V. 2. № 4. P. e000247.
182. Kamada T., Togashi Y., Tay C., Ha D., Sasaki A., Nakamura Y., Sato E., Fukuoka S., Tada Y., Tanaka A., et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019. V. 116. № 20. P. 9999–10008.
183. Wang X., Yang X., Zhang C., Wang Y., Cheng T., Duan L., Tong Z., Tan S., Zhang H., Saw P.E., et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020. V. 117. № 12. P. 6640–6650.
184. Wei J., Luo C., Wang Y., Guo Y., Dai H., Tong C., Ti D., Wu Z., Han W. // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2019. V. 7. № 1. P. 209.
185. Han X., Bryson P.D., Zhao Y., Cinay G.E., Li S., Guo Y., Siriwon N., Wang P. // *Mol. Ther*. 2017. V. 25. № 1. P. 274–284.
186. Zhao Y., Moon E., Carpenito C., Paulos C.M., Liu X., Brennan A.L., Chew A., Carroll R.G., Scholler J., Levine B.L., et al. // *Cancer Res*. 2010. V. 70. № 22. P. 9053–9061.
187. Tamada K., Geng D., Sakoda Y., Bansal N., Srivastava R., Li Z., Davila E. // *Clin. Cancer Res*. 2012. V. 18. № 23. P. 6436–6445.

188. Urbanska K., Lanitis E., Poussin M., Lynn R.C., Gavin B.P., Kelderman S., Yu J., Scholler N., Powell D.J. // *Cancer Res.* 2012. V. 72. № 7. P. 1844–1852.
189. Evans A.G., Rothberg P.G., Burack W.R., Huntington S.F., Porter D.L., Friedberg J.W., Liesveld J.L. // *British Journal of Haematology.* 2015. V. 171. № 2. P. 205–209.
190. Rodgers D.T., Mazagova M., Hampton E.N., Cao Y., Ramadoss N.S., Hardy I.R., Schulman A., Du J., Wang F., Singer O., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016. V. 113. № 4. P. E459-468.
191. Ma J.S.Y., Kim J.Y., Kazane S.A., Choi S.-H., Yun H.Y., Kim M.S., Rodgers D.T., Pugh H.M., Singer O., Sun S.B., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016. V. 113. № 4. P. E450-458.
192. Cho J.H., Collins J.J., Wong W.W. // *Cell.* 2018. V. 173. № 6. P. 1426-1438.e11.
193. D'Aloia M.M., Caratelli S., Palumbo C., Battella S., Arriga R., Lauro D., Palmieri G., Sconocchia G., Alimandi M. // *Cytotherapy.* 2016. V. 18. № 2. P. 278–290.
194. Raj D., Yang M.-H., Rodgers D., Hampton E.N., Begum J., Mustafa A., Lorzio D., Garces I., Propper D., Kench J.G., et al. // *Gut.* 2019. V. 68. № 6. P. 1052–1064.
195. Landgraf K.E., Williams S.R., Steiger D., Gebhart D., Lok S., Martin D.W., Roybal K.T., Kim K.C. // *Commun Biol.* 2020. V. 3. № 1. P. 296.
196. Wermke M., Kraus S., Ehninger A., Bargou R.C., Goebeler M.-E., Middeke J.M., Kreissig C., von Bonin M., Koedam J., Pehl M., et al. // *Blood.* 2021. V. 137. № 22. P. 3145–3148.
197. Clémenceau B., Congy-Jolivet N., Gallot G., Vivien R., Gaschet J., Thibault G., Vié H. // *Blood.* 2006. V. 107. № 12. P. 4669–4677.
198. Kudo K., Imai C., Lorenzini P., Kamiya T., Kono K., Davidoff A.M., Chng W.J., Campana D. // *Cancer Res.* 2014. V. 74. № 1. P. 93–103.
199. Cao Y., Rodgers D.T., Du J., Ahmad I., Hampton E.N., Ma J.S.Y., Mazagova M., Choi S.-H., Yun H.Y., Xiao H., et al. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2016. V. 55. № 26. P. 7520–7524.
200. Skerra A. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007. V. 18. № 4. P. 295–304.
201. Chinol M., Casalini P., Maggiolo M., Canevari S., Omodeo E.S., Caliceti P., Veronese F.M., Cremonesi M., Chiolerio F., Nardone E., et al. // *British journal of cancer.* 1998. V. 78. № 2. P. 189–197.
202. Kim M.S., Ma J.S.Y., Yun H., Cao Y., Kim J.Y., Chi V., Wang D., Woods A., Sherwood L., Caballero D., et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. V. 137. № 8. P. 2832–2835.
203. Shimizu Y., van Seventer G.A., Horgan K.J., Shaw S. // *Immunol. Rev.* 1990. V. 114. P. 109–143.
204. Salmon H., Franciszkiewicz K., Damotte D., Dieu-Nosjean M.-C., Validire P., Trautmann A., Mami-Chouaib F., Donnadieu E. // *J. Clin. Invest.* 2012. V. 122. № 3. P. 899–910.
205. Shilova O.N., Deyev S.M. // *Acta Naturae.* 2019. V. 11. № 4. P. 42–53.
206. Plückthun A. // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015. V. 55. P. 489–511.

207. Binz H.K., Stumpp M.T., Forrer P., Amstutz P., Plückthun A. // *Journal of Molecular Biology*. 2003. V. 332. № 2. P. 489–503.
208. Steiner D., Forrer P., Plückthun A. // *J Mol Biol*. 2008. V. 382. № 5. P. 1211–1227.
209. Zahnd C., Kawe M., Stumpp M.T., Pasquale C. de, Tamaskovic R., Nagy-Davidescu G., Dreier B., Schibli R., Binz H.K., Waibel R., et al. // *Cancer Res*. 2010. V. 70. № 4. P. 1595–1605.
210. Jost C., Schilling J., Tamaskovic R., Schwill M., Honegger A., Plückthun A. // *Structure*. 2013. V. 21. № 11. P. 1979–1991.
211. Hartley R.W. In: Nicholson A.W., ed. *Methods in Enzymology*. // Academic Press. 2001 (Accessed November 9, 2021). 599–611.
212. Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Plückthun A. // *Nature Biotechnology*. 2003. V. 21. № 12. P. 1486–1492.
213. Shramova E.I., Shilova M.V., Ryabova A.V., Dzhalilova D.S., Zolotova N.A., Telegin G.B., Deyev S.M., Proshkina G.M. // *Journal of Controlled Release*. 2021. V. 340. P. 200–208.
214. Shilova O., Kotelnikova P., Proshkina G., Shramova E., Deyev S. // *Molecules*. 2021. V. 26. № 22. P. 6785.
215. Michael Green N. In: Wilchek M., Bayer E.A., eds. *Methods in Enzymology*. // Academic Press. 1990.
216. Buckle A.M., Schreiber G., Fersht A.R. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. № 30. P. 8878–8889.
217. Chmielewski M., Hombach A., Heuser C., Adams G.P., Abken H. // *J Immunol*. 2004. V. 173. № 12. P. 7647–7653.
218. Park S., Shevlin E., Vedvyas Y., Zaman M., Park S., Hsu Y.-M.S., Min I.M., Jin M.M. // *Sci Rep*. 2017. V. 7. № 1. P. 14366.
219. Liu X., Jiang S., Fang C., Yang S., Olalere D., Pequignot E.C., Cogdill A.P., Li N., Ramones M., Granda B., et al. // *Cancer Res*. 2015. V. 75. № 17. P. 3596–3607.
220. Caruso H.G., Hurton L.V., Najjar A., Rushworth D., Ang S., Olivares S., Mi T., Switzer K., Singh H., Huls H., et al. // *Cancer Res*. 2015. V. 75. № 17. P. 3505–3518.
221. Drent E., Themeli M., Poels R., Jong-Korlaar R. de, Yuan H., Bruijn J. de, Martens A.C.M., Zweegman S., Donk N.W.C.J. van de, Groen R.W.J., et al. // *Molecular Therapy*. 2017. V. 25. № 8. P. 1946–1958.
222. Lynn R.C., Feng Y., Schutsky K., Poussin M., Kalota A., Dimitrov D.S., Powell D.J. // *Leukemia*. 2016. V. 30. № 6. P. 1355–1364.
223. Richman S.A., Nunez-Cruz S., Moghimi B., Li L.Z., Gershenson Z.T., Mourelatos Z., Barrett D.M., Grupp S.A., Milone M.C. // *Cancer Immunol Res*. 2018. V. 6. № 1. P. 36–46.
224. Arcangeli S., Rotiroti M.C., Bardelli M., Simonelli L., Magnani C.F., Biondi A., Biagi E., Tettamanti S., Varani L. // *Mol Ther*. 2017. V. 25. № 8. P. 1933–1945.

225. Frigault M.J., Lee J., Basil M.C., Carpenito C., Motohashi S., Scholler J., Kawalekar O.U., Guedan S., McGettigan S.E., Posey A.D., et al. // *Cancer Immunol Res.* 2015. V. 3. № 4. P. 356–367.
226. Kamiya T., Wong D., Png Y.T., Campana D. // *Blood Adv.* 2018. V. 2. № 5. P. 517–528.
227. Stefan N., Martin-Killias P., Wyss-Stoeckle S., Honegger A., Zangemeister-Wittke U., Plückthun A. // *J Mol Biol.* 2011. V. 413. № 4. P. 826–843.
228. Vorobyeva A., Schulga A., Konovalova E., Güler R., Löfblom J., Sandström M., Garousi J., Chernov V., Bragina O., Orlova A., et al. // *Sci Rep.* 2019. V. 9. P. 9405.
229. Shipunova V.O., Zelepukin I.V., Stremovskiy O.A., Nikitin M.P., Care A., Sunna A., Zvyagin A.V., Deyev S.M. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018. V. 10. № 20. P. 17437–17447.
230. Rushizky G.W., Greco A.E., Hartley R.W., Sober H.A. // *Biochemistry.* 1963. V. 2. № 4. P. 787–793.
231. Testi R., Phillips J.H., Lanier L.L. // *J Immunol.* 1989. V. 143. № 4. P. 1123–1128.
232. Shah N.N., Fry T.J. // *Nat Rev Clin Oncol.* 2019. V. 16. № 6. P. 372–385.
233. Thommen D.S., Schumacher T.N. // *Cancer Cell.* 2018. V. 33. № 4. P. 547–562.
234. Simon S., Voillet V., Vignard V., Wu Z., Dabrowski C., Jouand N., Beauvais T., Khammari A., Braudeau C., Josien R., et al. // *J Immunother Cancer.* 2020. V. 8. № 2. P. e001631.
235. Liu Z., Zhou Q., Wang Z., Zhang H., Zeng H., Huang Q., Chen Y., Jiang W., Lin Z., Qu Y., et al. // *J Immunother Cancer.* 2020. V. 8. № 2. P. e000978.
236. Ostroumov D., Duong S., Wingerath J., Woller N., Manns M.P., Timrott K., Kleine M., Ramackers W., Roessler S., Nahnsen S., et al. // *Hepatology.* 2021. V. 73. № 4. P. 1399–1418.
237. Wherry E.J., Kurachi M. // *Nat Rev Immunol.* 2015. V. 15. № 8. P. 486–499.
238. Tantaló D.G., Oliver A.J., von Scheidt B., Harrison A.J., Mueller S.N., Kershaw M.H., Slaney C.Y. // *J Immunother Cancer.* 2021. V. 9. № 5. P. e002555.
239. Mironova K.E., Chernykh O.N., Ryabova A. V., Stremovskiy O.A., Proshkina G.M., Deyev S.M. // *Biochemistry (Moscow).* 2014. V. 79. № 12. P. 1391–1396.
240. Zahnd C., Wyler E., Schwenk J.M., Steiner D., Lawrence M.C., McKern N.M., Pecorari F., Ward C.W., Joos T.O., Plückthun A. // *Journal of Molecular Biology.* 2007. V. 369. № 4. P. 1015–1028.
241. Kupryushkin M.S., Filatov A.V., Mironova N.L., Patutina O.A., Chernikov I.V., Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A., Altman S., et al. // *Mol Ther Nucleic Acids.* 2022. V. 27. P. 211–226.
242. Korchuganov D.S., Schulga A.A., Ermolyuk Ya.S., Mitkevich V.A., Reibarkh M.Ya., Nolde S.B., Makarov A.A., Arseniev A.S., Kirpichnikov M.P. // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2004. V. 30. № 6. P. 577–581.
243. George R.A., Heringa J. // *Protein Eng.* 2002. V. 15. № 11. P. 871–879.

244. Bishop D.C., Xu N., Tse B., O'Brien T.A., Gottlieb D.J., Dolnikov A., Micklethwaite K.P. // *Mol Ther.* 2018. V. 26. № 8. P. 1883–1895.
245. Schäfer D., Henze J., Pfeifer R., Schleicher A., Brauner J., Mockel-Tenbrinck N., Barth C., Gudert D., Al Rawashdeh W., Johnston I.C.D., et al. // *Frontiers in Immunology.* 2020. V. 11. P. 1704.
246. Albanell J., Baselga J. // *Drugs Today (Barc).* 1999. V. 35. № 12. P. 931–946.
247. Lu Y.J., Chu H., Wheeler L.W., Nelson M., Westrick E., Matthaei J.F., Cardle I.I., Johnson A., Gustafson J., Parker N., et al. // *Front Oncol.* 2019. V. 9. P. 151.
248. Weber E.W., Parker K.R., Sotillo E., Lynn R.C., Anbunathan H., Lattin J., Good Z., Belk J.A., Daniel B., Klysz D., et al. // *Science.* 2021. V. 372. № 6537. P. eaba1786.
249. Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Plückthun A. // *Nat Biotechnol.* 2003. V. 21. № 12. P. 1486–1492.
250. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. // *BioEssays.* 2008. V. 30. № 8. P. 781–790.
251. Fang E.F., Ng T.B. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer.* 2011. V. 1815. № 1. P. 65–74.
252. Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. // *The FEBS Journal.* 2011. V. 278. № 19. P. 3633–3643.
253. Shipunova V., Komedchikova E.N., Sogomonyan A.S., Stepanov A.V., Tereshina E.D., Belova M.M., Kotelnikova P.A., Nikitin M.P., Deyev S.M. Two-Step Targeted Drug Delivery via Proteinaceous Barnase-Barstar Interface and PLGA-Based Nano-Carrier. // *In Review.* 2022 (Accessed April 21, 2022).
254. Spång H.C.L., Braathen R., Bogen B. // *PLOS ONE.* 2012. V. 7. № 9. P. e45393.
255. Braathen R., Spång H.C.L., Hinke D.M., Blazevski J., Bobic S., Fossum E., Bogen B. // *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development.* 2020. V. 17. P. 378–392.