

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

На правах рукописи

Степанов Алексей Вячеславович

**Селективная клеточная иммунотерапия онкологических
заболеваний**

Специальность 1.5.3 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва, 2025

Работа выполнена в лаборатории биокатализа отдела белково-пептидных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного Научного Центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН).

Официальные оппоненты:

Сергей Артурович Недоспасов, академик РАН, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярных механизмов иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Алексей Николаевич Томилин, чл.-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук.

Илья Андреевич Кофиади, чл.-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммуногенетики Федерального государственного бюджетного учреждения “Государственный научный центр “Институт иммунологии” Федерального медико-биологического агентства.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук

Защита состоится 26 ноября 2025 года в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при ГНЦ ИБХ РАН по адресу:
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.ibch.ru ГНЦ ИБХ РАН.

Автореферат разослан « » 2025 года.

**Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук
В.А. Олейников**



I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Развитие иммунологии, понимания механизмов онкогенеза, молекулярной биологии и генной инженерии позволило не только расширить объём знаний в каждой из областей науки, но и изменять иммунные клетки для терапии раковых и аутоиммунных заболеваний. Одним из новых и наиболее бурно развивающихся направлений является адоптивная иммунотерапия онкологических заболеваний с помощью генетически модифицированных иммунных клеток пациента или здорового донора. На сегодняшний день существует семь препаратов CAR T клеток, одобренных к применению управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA). Данные CAR T клетки направлены на два антигена на поверхности В клеток, CD19 и В клеточному антигену созревания (BCMA). Большая часть CAR T клеток специфичных к CD19 и BCMA производится на специализированных производствах, принадлежащих крупным фармацевтическим компаниям.

Впечатляющие результаты клинического применения CAR T клеток, специфичных к CD19, выдвинули CAR T клеточную терапию на место самой обсуждаемой и перспективной терапии многих видов рака. Однако, при ближайшем рассмотрении и массовом проведении клинических испытаний оказалось, что химерные антигенные рецепторы не лишены недостатков и несут опасность для пациента. На первое место стала выдвигаться не столько эффективность сколько безопасность и фармакодинамический контроль над терапией. Современная адоптивная иммунотерапия CAR T клетками заключается во введении пациенту живых клеток с существенным потенциалом к делению и активации, процессы, которые сложно корректировать или остановить. Длительная или избыточная активность CAR T клеток часто приводит к развитию синдрома выброса цитокинов, гиперактивации иммунной системы, нейротоксичности, истощению CAR T клеток, и, как следствие, недостаточной эффективности и возникновению рецидивов опухоли. В данной работе описано создание регулируемых CAR T клеток, активность которых контролируется с помощью белковых или низкомолекулярных адаптерных молекул. Разделение этапов распознавания и уничтожения опухолевых клеток с помощью адаптерных молекул позволило настраивать чувствительность CAR T лимфоцитов к количеству опухоль-ассоциированного антигена, а также контролировать персистенцию и активность модифицированных T клеток *in vivo*. Существенным ограничением создания низкомолекулярных адаптерных молекул для CAR T клеток является ограниченный выбор известных соединений, специфически связывающихся с опухолевыми антигенами. В

диссертационной работе для поиска новых органических лигандов опухолевых антигенов был проведен скрининг ДНК-кодированных библиотек химических соединений DEL (DNA encoded library; DEL).

Также, важной проблемой, связанной с возможным расширением области применения CAR T клеток стал выбор антигена опухоли. Основными критериями при выборе опухолевого антигена является отсутствие его экспрессии на здоровых тканях и органах (для предотвращения неспецифической токсичности), а также эффекторных клетках, несущих CAR (например T клетках, для предотвращения перекрестной токсичности между CAR T клетками). На сегодняшний день при выборе антиген-распознающих доменов CAR чаще всего используют переменные домены известных антител. Такой подход позволяет использовать хорошо охарактеризованные антитела и повышает безопасность создаваемых CAR, однако значительно сужает выбор таргетируемых антигенов или вовсе делает невозможным применение CAR T клеточной терапии. В диссертационной работе предложен новый способ создания опухолевоспецифичных CAR для терапии лимфом и лейкозов. Данный подход, основанный на скрининге лентивирусных библиотек химерных рецепторов в системе репортерных T клеток, а также фагового дисплея иммуноглобулинов человека, позволяет получить CAR T клетки распознающие уникальные антигены, представленные исключительно на опухолевых клетках.

С другой стороны, в некоторых случаях, необходимо создание CAR T клеток специфичных к антигену, представленному на разных типах клеток. В диссертационной работе описано создание CAR T клеток специфичных к CD45, которые позволяют объединить этапы кондиционирования пациента перед алло-ТГСК и терапию рака, что, возможно, обеспечит более глубокую элиминацию гемопоэтических клеток пациента и снизит частоту рецидива после трансплантации.

Высокая эффективность анти-CD19 CAR T клеток при терапии лейкозов у детей инициировала разработку целой панели химерных антигенных рецепторов для онкологических заболеваний взрослых пациентов. Однако, результаты клинического применения показали, что CAR T клетки оказались недостаточно эффективными для терапии солидных опухолей. К основным причинам низкой эффективности в этом случае следует отнести гетерогенность опухоли, недостаточную специфичность антигенов, а также иммуносупрессивное микроокружение опухоли, которое препятствует активности и инфильтрации CAR T клеток в опухолевую ткань. К недавно открытым иммуносупрессивным факторам микроокружения опухоли можно отнести ингибиторы

контрольных точек иммунного ответа, внеклеточные везикулы, выделяемые клетками опухоли, а также внеклеточные ловушки нейтрофилов (NETs). В данной диссертационной работе были созданы CAR T клетки устойчивые к ингибиторам контрольных точек, исследовано влияние опухолевых везикул и NETs на T и CAR T клетки.

Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы является увеличение безопасности и специфичности CAR T клеток, поиск новых антигенов для адоптивной иммунотерапии, разработка новых способов получения CAR T клеток, а также изучение влияния опухолевого микроокружения на активность модифицированных клеток.

Были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать новые подходы к созданию регулируемых CAR T клеток с возможностью контроля их активности *in vitro* и *in vivo*.
2. Исследовать новые методы поиска и выбора опухоль-специфичных антигенов для повышения селективности CAR T клеточной терапии.
3. Провести скрининг ДНК-кодированных библиотек химических соединений (DEL) для поиска новых органических лигандов опухолевых антигенов.
4. Изучить влияние факторов микроокружения опухоли на CAR T клетки и предложить способы их преодоления.
5. Изучить терапевтический потенциал CAR19 Тм клеток, сформированных из популяции клеток памяти, для терапии пациентов с В-ОЛЛ в рецидиве после алло-ТГСК.
6. Создать CAR T клетки, специфичные к CD45, для повышения эффективности и снижения риска рецидива после трансплантации гемопоэтических клеток.

Научная новизна работы и практическая значимость работы

В диссертационной работе предложен новый подход, основанный на создании опухоль-специфичных CAR для терапии лимфом и лейкозов с помощью скрининга лентивирусных библиотек химерных рецепторов и репортерных T клеток, а также фагового дисплея иммуноглобулинов человека.

Для увеличения безопасности адоптивной иммунотерапии созданы регулируемые CAR T клетки, активность которых контролируется с помощью белковых или низкомолекулярных адаптерных молекул. Разделение этапов распознавания и уничтожения опухолевых клеток с помощью адаптерных молекул позволило “настраивать чувствительность” CAR T лимфоцитов к количеству опухоль-ассоциированного антигена, а также контролировать персистенцию и активность модифицированных T клеток *in vivo*.

Для расширения областей применения регулируемых CAR T клеток проведен скрининг ДНК-кодированных библиотек химических соединений DEL, в результате которого были обнаружены новые низкомолекулярные лиганды опухолевых антигенов.

Для терапии пациентов с В-ОЛЛ с рецидивом после алло-ТГСК предложен новый подход клинического применения CAR19 Тм клеток, сформированных из популяции клеток памяти. Вместе с сотрудниками исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева было проведено первое в мире применение CAR19 Тм клеток и показана их эффективность. Также, в диссертационной работе описано создание генетически отредактированных CAR Т клеток специфичных к CD45, которые позволяют объединить этапы кондиционирования пациента перед алло-ТГСК и терапию рака, что возможно обеспечит более глубокую элиминацию гемопоэтических клеток пациента и снизит вероятность рецидива после трансплантации. Также, в работе описан опыт децентрализованного производства CAR Т клеток.

Для преодоления иммуносупрессивного действия солидных опухолей на CAR Т клетки был разработан внутриклеточный блокатор выхода PD-1 на поверхность CAR Т клетки. Впервые показано ингибирующее действие опухолевых экзосом на CAR Т клетки. Получены первые антитела агонисты человека специфичные к рецептору тропомиозиновой тирозинкиназы В (TrkB), которые на данный момент находятся на первой фазе клинических испытаний. Вместе с тем, в диссертационной работе рассмотрены подходы получения препаратов нейтрализующих антител человека из пациентов и антител-агонистов. Благодаря разработанным комбинаторным методам скрининга удалось получить специфические вирус-нейтрализующие антитела, а также антитела агонисты рецептора тропомиозиновой тирозинкиназы В (TrkB), которые на данный момент находятся на первой фазе клинических испытаний.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Фаговый дисплей и скрининг лентивирусных библиотек химерных рецепторов в системе репортерных клеток позволяют получить CAR специфичные к В- и Т-клеточным рецепторам опухолевых клонов для адоптивной иммунотерапии лимфом и лейкозов. Полученные CAR Т клетки специфически элиминируют опухолевые клетки как *ex vivo*, так и *in vivo*.
2. Использование комбинаторных библиотек антител и аутокринной клеточной селекции трансмембранно-заякоренных антител позволили получить антитела вирус-нейтрализующие антитела, а также антитела агонисты рецептора тропомиозиновой тирозинкиназы В (TrkB).

3. С применением технологии геномного редактирования для нокаута гена *PTPRC* были разработаны CD45^Δ CAR45 Т клетки специфичные к CD45, которые позволяют объединить этапы кондиционирования пациента перед алло-ТГСК и терапию рака.
4. Разработаны регулируемые CAR Т клетки, активность которых контролируется с помощью белковых или низкомолекулярных адаптерных молекул. Разделение этапов распознавания и уничтожения опухолевых клеток с помощью адаптерных молекул позволило настраивать чувствительность CAR Т лимфоцитов к количеству опухоль-ассоциированного антигена *in vitro*, а также контролировать персистенцию и активность модифицированных Т клеток *in vivo*.
5. Впервые показано, что ДНК-кодированные библиотеки химических соединений позволяют де-ново обнаружить низкомолекулярные лиганды опухолевых антигенов и направлять цитотоксичность CAR Т клеток.
6. Были разработаны искусственные везикулы, несущие антиген CAR, добавление которых в культуру CAR Т клеток оказывает положительное влияние на популяцию CAR-положительных клеток, активируя их и стимулируя пролиферацию *in vitro* и *in vivo*.
7. Показано, что внеклеточная ДНК, в частности внеклеточные ловушки нейтрофилов, оказывают иммуносупрессивную роль в микроокружении опухоли, снижая активность Т клеток. Введение аденоассоциированных вирусов кодирующих ДНКазу I позволяет восстановить иммунный ответ в микроокружении опухоли и увеличить эффективность CAR Т клеток в сингенной модели меланомы мыши с метастазами в легкие.
8. Изучена регуляторная роль опухолевых экзосом в активности CAR Т клеток. Они могут как активировать, так и подавлять, функцию CAR Т клеток в зависимости от паттерна поверхностных молекул.
9. Показано, что экспрессия CAR с внутриклеточным блокатором PD-1 позволяет преодолеть иммуносупрессивное действие опухолевых клеток с повышенной экспрессией PD-L1, однако приводит к быстрому истощению Т клеток.
10. Показана эффективность децентрализованной модели производства CAR Т клеток с помощью автоматизированных систем закрытого типа. Впервые показана противоопухолевая активность аллогенных CAR19 Тm клеток в пациентах.

Апробация и публикации работы

Результаты работы представлены на более чем 15 ведущих международных и всероссийских научных мероприятиях. По теме диссертации опубликовано 22 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus.

Структура диссертации

Диссертационная работа представлена на 236 страницах, структура включает следующие разделы: Оглавление, Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список цитируемой литературы, включающий 409 источника. Диссертация содержит 81 рисунок и 2 таблицы.

Личный вклад автора

Химерные антигенные рецепторы были получены и протестированы *in vitro* и *in vivo* лично или под руководством автора. Работы по созданию опухоль-специфичных CAR T клеток для терапии лимфом и лейкозов, а также регулируемых CAR T клеток на основе каталитического антитела 38C2 проводились лично автором. Работы, связанные с клиническим применением CAR T клеток выполнены в сотрудничестве с исследовательским центром детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева под руководством проф. Масчана М.А. и Онкологического центра Университетских госпиталей имени Сейдмана (University Hospitals Seidman Cancer Center; Кливленд, США). Работы, посвященные контролю противоопухолевой активности и специфичности CAR T клеток с помощью молекулярной пары барназа – барстар выполнены совместно с академиком Сергеем Михайловичем Деевым и сотрудниками его лаборатории в ГНЦ ИБХ РАН. При сотрудничестве с исследователями из филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (Филиал ГНЦ ИБХ РАН) под руководством автора был получен ряд уникальных животных моделей опухолевых заболеваний. А также проведены первые в России испытания эффективности CAR T клеток на животных моделях. Под руководством автора были получены мышинные модели предтрансплантационной подготовки пациентов перед трансплантации гемопоэтических стволовых клеток с подсаженными мононуклеарными клетками крови пациентов. Под руководством автора были успешно защищены три кандидатские диссертации.

Автор диссертации на всех этапах готовил работы к публикациям в научных журналах (планирование работ, анализ данных, написание текста, оформление, ответы рецензентам).

II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Обзор литературы представлен семью основными разделами. Обзор литературы посвящен описанию структуры химерных антигенных рецепторов, а также способам и особенностям производства CAR T клеток. Рассмотрены подходы к увеличению безопасности CAR T клеточной терапии и выбору опухоль-ассоциированному антигена. Проведен полный анализ современных подходов к созданию мировой модульных химерных антигенных рецепторов. Рассмотрена роль иммуносупрессивного микроокружения опухоли при терапии CAR T клетками.

Экспериментальная часть

Создание опухоль-специфичных CAR T клеток для терапии лимфом и лейкоз

Основной задачей при создании противоопухолевой иммунотерапии является выбор подходящих маркеров на поверхности раковых клеток. Опухолевый антиген не должен присутствовать на здоровых тканях и органах для предотвращения неспецифической токсичности (мишень/вне опухоли; on-target off-tumor toxicities), а также эффекторных клеток, несущих CAR (например T клетках, для предотвращения перекрестной токсичности между CAR клетками). Отличительной особенностью многих лимфом и лейкоз является наличие уникальных и опухолеспецифичных антигенов – B- и T-клеточных рецепторов (B cell receptor, BCR; и T cell receptor, TCR). Уникальная последовательность данных рецепторов формируется в процессе развития иммунных клеток и является уникальной для опухолевого клона. BCR и TCR опухолевых клеток можно использовать в качестве мишени для CAR T клеток. Такой подход позволяет повысить направленность и эффективность терапии, минимизировать риски, связанные с повреждением здоровых тканей и снизить вероятность развития резистентности. В результате индивидуальные CAR могут стать важным инструментом в прецизионной терапии онкозаболеваний, обеспечивая более таргетированное и безопасное лечение, особенно при редких или трудно поддающихся лечению формах рака. Мы поставили задачу разработать подходы получения опухоль-специфичных CAR для терапии лимфом и лейкоз с помощью скрининга лентивирусных библиотек химерных рецепторов и репортерных T клеток, а также фагового дисплея иммуноглобулинов человека.

Для быстрого поиска лигандов B-клеточных рецепторов опухолевых клонов было предложено использовать систему репортерных клеток и лентивирусную библиотеку циклопептидов в составе химерного рецептора. Логически создание такой системы и проведение раундов отбора можно разделить на несколько ключевых этапов: поиск B-

клеточного рецептора опухолевых клеток; создание репортерных клеток, несущих данный рецептор; трансдукция репортерных клеток лентивирусной библиотекой, кодирующей трансмембранно-заякоренные лиганды; отбор активированных клеток, несущих ген провзаимодействовавшего лиганда; создание суб-библиотеки после первого раунда отбора; повторение отбора (**Рис. 1**).

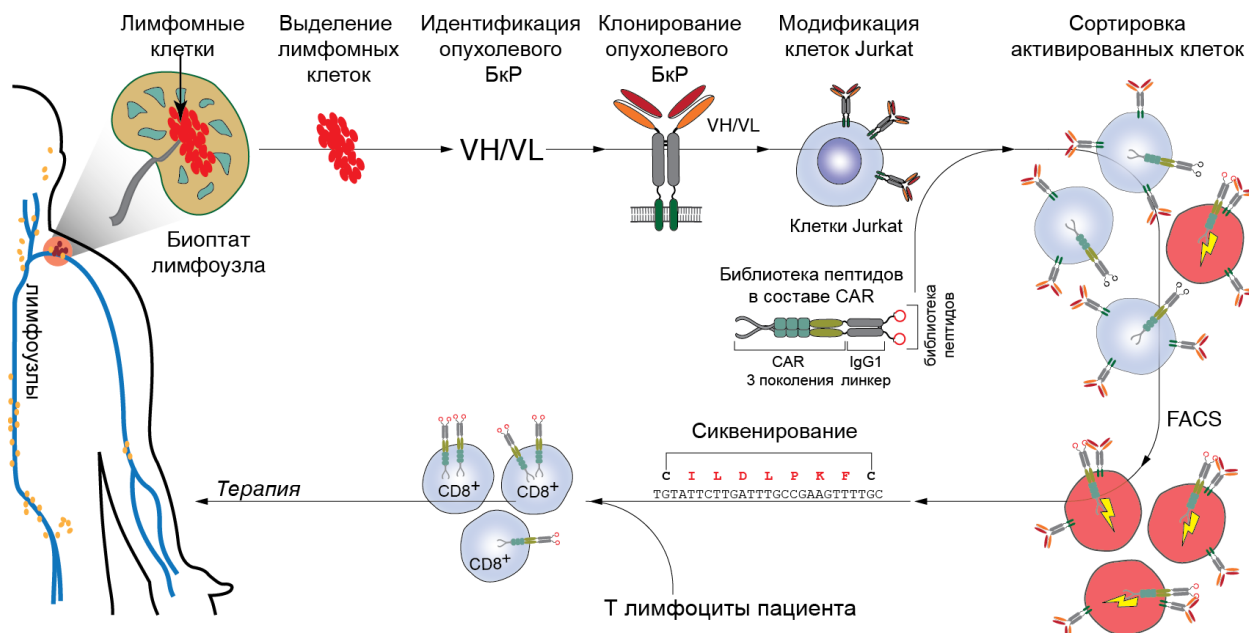


Рисунок 1 Схематическое изображение принципа разработанного подхода получения CAR T клеток, направленно элиминирующих опухолевые лимфоциты. Гены В-клеточных рецепторов из биопсии лимфатического узла от пациента с фолликулярной лимфомой (ФЛ) клонировали в виде мембраносвязанных В-клеточных рецепторов (мембранный домен из рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFR)). Их ко-экспрессируют 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 активированных клеток Jurkat выбранные пептиды, слитые с CAR, секвенируют и используют для получения терапевтических T-лимфоцитов, модифицированных опухолеспецифическим CAR.

Биоптаты лимфоузлов пациентов с диагнозом фолликулярная лимфома (ФЛ) были отобраны в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. Отобранные образцы были использованы для определения последовательности В-клеточных рецепторов опухолевых клеток пациентов. Для создания репортерных клеток были получены клетки Jurkat, несущие трансмембранно-заякоренные BCR опухолевых клеток. Принцип действия созданной репортерной системы заключается в экспрессии восстановленного В-клеточного рецептора и ко-экспрессии одного из вариантов лиганда из лентивирусной библиотеки циклопептидов в составе CAR. Если опухолевый иммуноглобулин связывает пептид из библиотеки, то внутриклеточная сигнальная часть приводит к активации клеток Jurkat и экспрессии гена белка ранней активации лимфоцитов CD69 (**Рис. 2А**). Работоспособность репортерной системы была подтверждена с CAR специфичного к эпитопу с-Мус (**Рис. 2Б**).

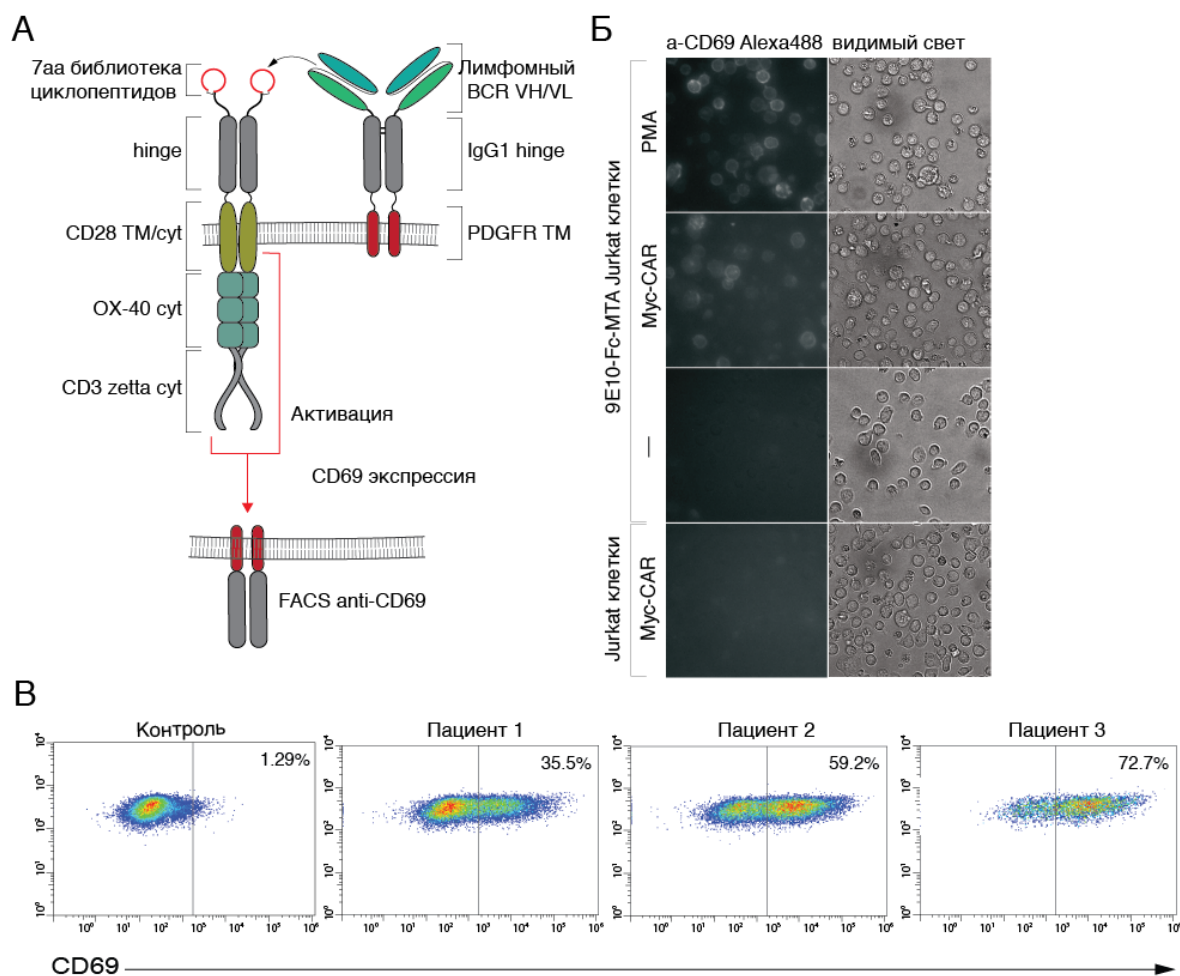


Рисунок 2 Аутокринный дисплей библиотеки циклопептидов в составе CAR для поиска лигандов В-клеточных рецепторов лимфомных клеток. **(А)** Принцип работы репортерной системы. **(Б)** Подтверждение функциональности созданной репортерной системы с помощью известной пары эпитоп тус и анти-тус антитело (клон 9E10). Для положительного контроля клетки обрабатывались РМА который активирует Т клетки. **(В)** Активация репортерных клеток на 4 раунде селекции циклопептидов специфичных к В клеточным рецепторам опухолевых лимфоцитов. Произведен отбор специфических пептидов для трех пациентов с диагнозом фолликулярная лимфома.

Для проведения аутокринного отбора опухолеспецифичных пептидов в составе CAR репортерные клетки Jurkat-BCR трансдуцировали лентивирусными частицами библиотеки. Полученные генетические конструкции были использованы для наработки лентивирусных частиц и трансдукции линии Т клеток человек Jurkat. Далее, клетки Jurkat-BCR, несущие В-клеточные рецепторы опухолевых клеток (Jurkat-ФЛ1, Jurkat- ФЛ2, Jurkat- ФЛ3 итд.), были отсортированы методом FACS и использованы в качестве репортерных клеток для проведения раундов отбора лигандов опухолевых клеток. После четырех раундов отбора были отобраны циклопептиды специфичные к BCR опухолевых клеток трех пациентов с ФЛ (**Рис. 2В**). Отобранные циклопептиды CILDLPKFC (ФЛ1), CMPHWQNHC (ФЛ2) и CTTDQARKC (ФЛ3) в составе CAR специфически активировали Jurkat с соответствующим

В-клеточным рецептором пациента и не взаимодействовали с BCR опухолевых клонов полученных других пациентов.

Далее была проведена оценка эффективности и специфичности созданных CAR *in vitro* и *in vivo*. Для проведения цитотоксических тестов были получены клетки линии Raji содержащие BCR опухолевых клеток. Цитофлуориметрический анализ подтвердил экспрессию BCR, а также взаимодействие биотинилированных пептидов ФЛ1, ФЛ2 и ФЛ3 с опухолевым В-клеточным рецептором (**Рис. 3А**). Инкубация опухолевых клеток, экспрессирующих BCR и CAR Т клеток показала, что цитотоксичность ФЛ1-CAR, ФЛ2-CAR и ФЛ3-CAR Т клеток сравнима с CAR19 Т клетками. Более того, CAR Т клетки, содержащие отобранные циклопептиды лизировали только опухолевые клетки, несущие BCR опухолевого клона соответствующего пациента (**Рис. 3Б**). Для подтверждения специфичности отбираемых циклопептидов было проведено окрашивание биоптата пациента #1 биотинилированным пептидом ФЛ1. Как видно из данных, приведенных на **рисунке 3В**, пептид ФЛ1 специфически окрашивает популяцию опухолевых клеток. Дополнительным подтверждением специфичности отобранных ФЛ1-CAR послужил анализ цитотоксичности CAR Т клеток в отношении лимфомных клеток пациента (**Рис. 3Г**). Сравнительный анализ ФЛ1-CAR и CAR19 Т клеток на животной модели фолликулярной лимфомы показал практически одинаковую терапевтическую эффективность ФЛ1-CAR и CD19 CAR Т клеток (**Рис. 4**).

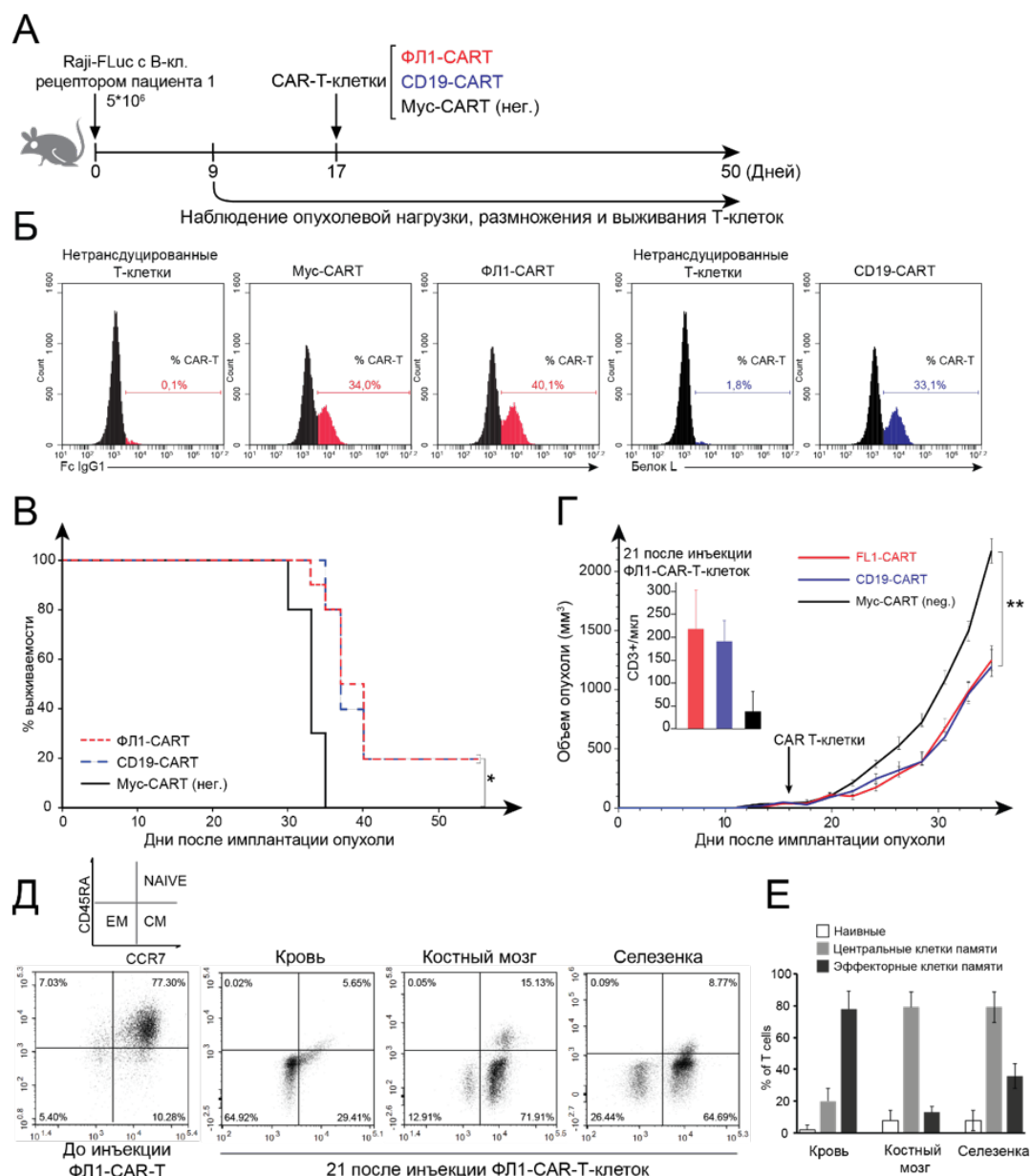


Рисунок 4 Анализ эффективности персонифицированных ФЛ1-CAR и CAR19 Т клеток на животной модели фолликулярной лимфомы. **(А)** Схема эксперимента. Мышам NSG прививали 5×10^6 клеток Raji-ФЛ1. После рандомизированного разбиения на группы на 17-й день мышам внутривенно вводили 3×10^6 ФЛ1-CAR, CAR19 или Мус-CAR Т клеток. **(Б)** Оценка эффективности трансдукции активированных CD8⁺ Т клеток человека лентивирусными векторами: ФЛ1-CAR, Мус-CAR и CAR19. Клетки окрашивали IgG1-специфическим антителом или белком L. **(В)** Кривые выживаемости животных, которым вводили персонифицированные ФЛ-1 CAR, CAR19 и контрольные Мус-CAR Т клетки. **(Г)** Динамика роста опухоли у животных из экспериментальных групп ФЛ1. **(Д, Е)** Цитофлуориметрический анализ фенотипа CAR Т клеток в периферической крови, костном мозге и селезенке.

Таким образом, аутокринный метод селекции позволяет отбирать направляющие циклопептиды для персонализированной CAR Т терапии В-клеточной лимфомы. Эффективность CAR с циклопептидами сопоставима с хорошо охарактеризованным анти-CD19 CAR как *ex vivo*, так и *in vivo*. Одним из преимуществ данного скрининга является то, что при селекции распознающей части CAR отбираемый пептид уже находится в составе

химерного рецептора и не требует дополнительных этапов клонирования. В отличие от большинства CAR, в которых антитело в составе химерного антигенного рецептора распознаёт антиген на поверхности опухолевой клетки, циклопептиды в составе CAR сами выступают в роли мишени, а антитело на поверхности опухоли инициирует распознавание и активацию CAR.

Дополнительно нами была показана возможность направленной элиминации опухолевых клеток CAR T клетками при терапии Т клеточной лимфомы и лейкемии. Так же, как и для разработанного подхода терапии В клеточных лимфом, за основу был взят поиск уникальной последовательности поверхностного иммуноглобулина Т клеток, отличающей опухолевый клон от здоровых лимфоцитов. Для этой цели в качестве мишени нами был выбран участок CDR3 Т клеточного рецептора (TCR). Был использован фаговый дисплей библиотеки одноцепочечных антител человека для создания CAR специфичных к рецепторам опухолевых Т лимфоцитов (Рис. 5).

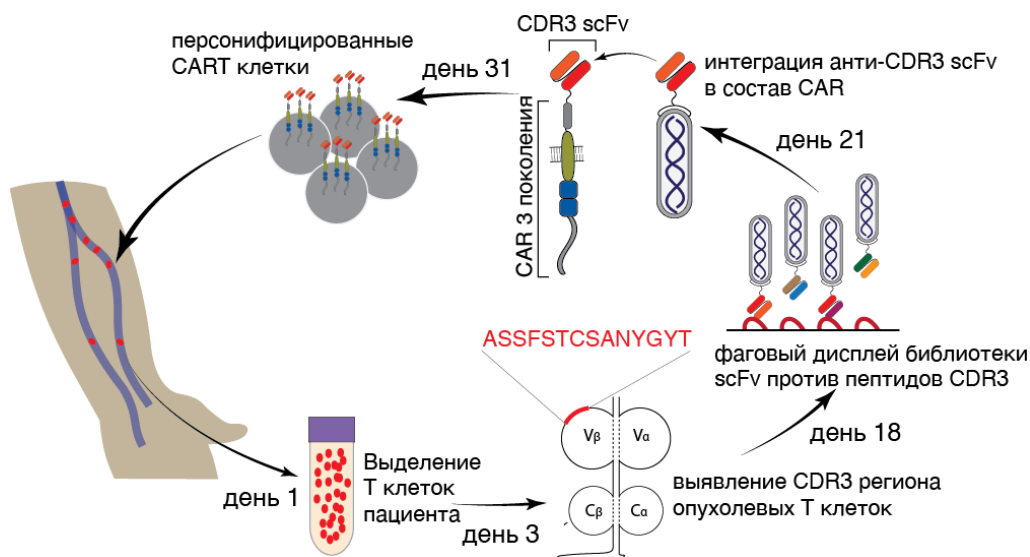


Рисунок 5 Схема разработанного подхода получения CAR T клеток, специфичных к опухолевым Т-клеточным рецепторам, для терапии лимфомы и лейкемии.

В исследование были включены 9 пациентов с диагнозом Т клеточная лимфома и лейкемия. Методом NGS были идентифицированы последовательности CDR3 раковых клеток всех пациентов, а также клеток Jurkat и MOLT-4. Обнаруженные последовательности CDR3 Т клеточных рецепторов опухолевых клеток пациентов были синтезированы в виде пептидов и использованы для поиска scFv, специфичных к данным последовательностям методом фагового дисплея. Нуклеотидные последовательности отобранных scFv были встроены в химерные антигенные рецепторы в качестве узнающей антиген части и использованы для модификации Т лимфоцитов и дальнейших экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

Отобранные scFv, специфичные к участку CDR3 Т клеточного рецептора раковых клеток пациентов #1, #6, #8, а также клеток Jurkat и MOLT-4, были использованы для окрашивания биоптатов пациентов и клеточных линий (**Рис. 6**). Окрашивание биоптатов и клеточных линий показало, что отобранные scFv специфически распознают опухолевые клетки на срезах биоптатов пациентов, а также клетки Jurkat и MOLT-4. В свою очередь, контрольные scFv не демонстрируют неспецифического окрашивания. Чтобы подтвердить уникальную специфичность отобранных scFv и доказать безопасность отобранных scFv по отношению к здоровым тканям был проведен гистологический анализ окрашивания срезов печени, костного мозга, селезенки и лимфоузлов.

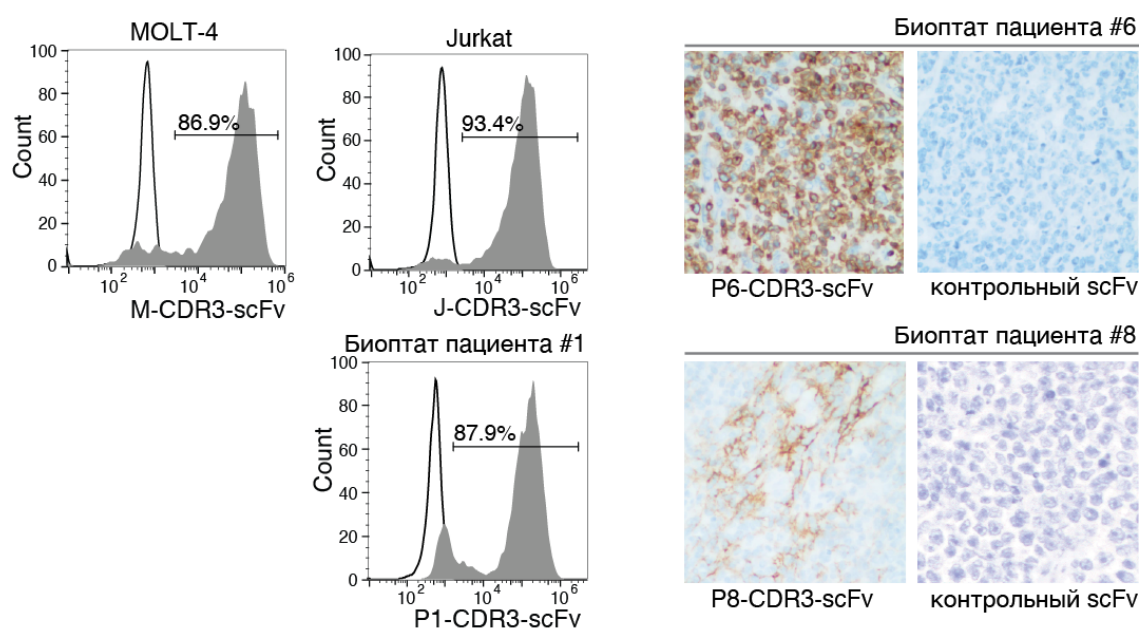


Рисунок 6 Окрашивание биоптатов пациентов и клеточных линий scFv, специфичных к участку CDR3 Т клеточного рецептора раковых клеток пациентов #1 (P1-CDR3-scFv), #6 (P6-CDR3-scFv), #8 (P8-CDR3-scFv), а также клеток Jurkat (J-CDR3-scFv) и MOLT-4 (M-CDR3-scFv).

Далее scFv, специфичные к CDR3 TCR пациентов #1, #6 и #8, а также клеток Jurkat и MOLT-4 были включены в состав генетических конструкций, кодирующих химерные антигенные рецепторы. Полученные CAR Т клетки эффективно элиминировали опухолевые клетки *in vitro*, а также специфически секретировали провоспалительные цитокины ИНФ гамма и ИЛ-2 (**Рис. 7А**). Одним из наиболее показательных примеров эффективности и безопасности предлагаемого подхода было проведение анализа репертуара Т клеточных рецепторов биоптата пациента #1 после ко-инкубации клеток пациента с CAR Т клетками специфичными к TCR опухолевых клеток (P#1-CAR). Как видно из данных, представленных на **рисунке 7Б**, добавление к биопсийному материалу CAR Т клеток специфичных к TCR Jurkat (J-CAR) не отразилось на количестве клеток опухолевого клона, в свою очередь, при добавлении P#1-CAR опухолевые Т клетки были

полностью элиминированы, а здоровые Т клетки остались нетронутыми. Далее было проведено сравнение терапевтической эффективности персонифицированных CAR Т на модельных животных. Полученные результаты демонстрируют высокую эффективность элиминации опухолевых Т клеток *in vivo*, а также существенное увеличение выживаемости в терапевтических группах по сравнению с животными, получившими контрольные CAR Т клетки (Рис. 7В,Г).

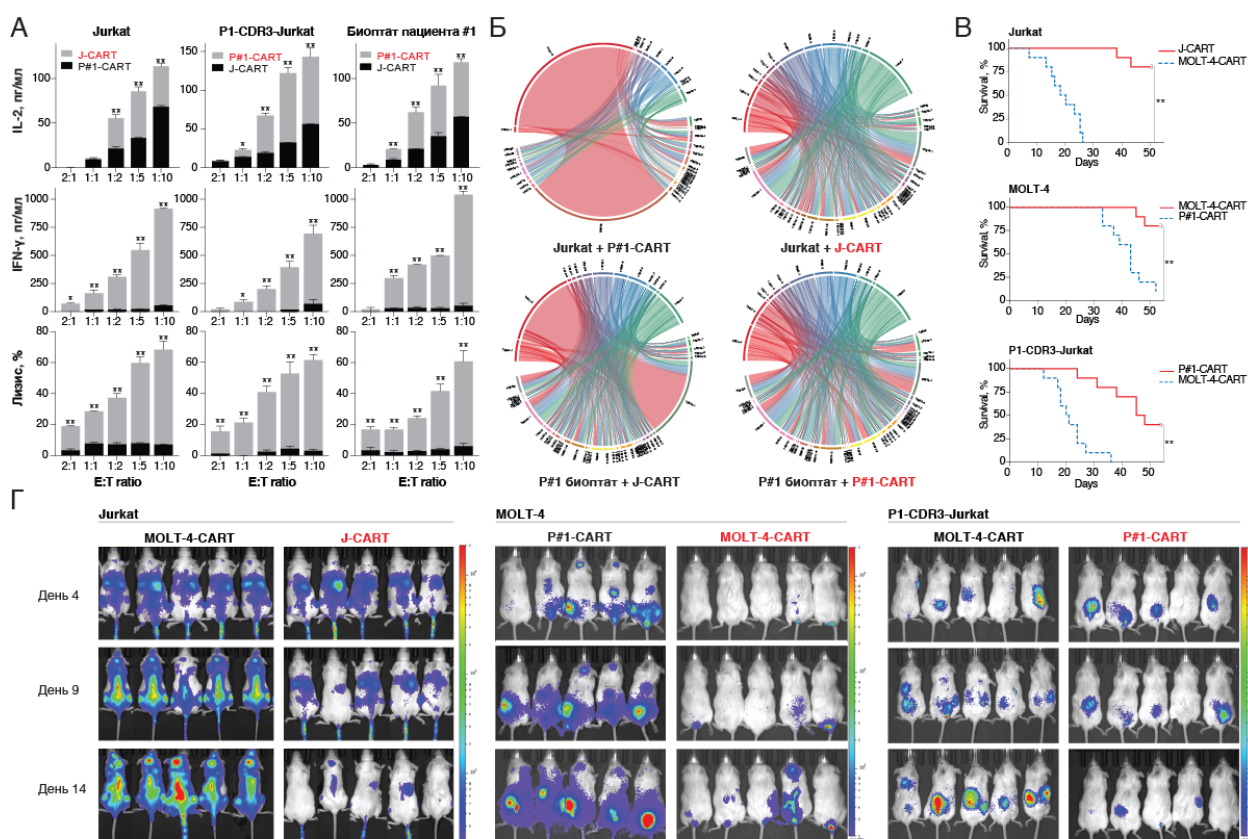


Рисунок 7 Анализ функциональной активности CAR Т клеток, специфичных к CDR3 участкам Т-клеточного рецептора опухолевых клеток. (А) CDR3-специфичные CAR Т клетки эффективно элиминируют опухолевые клетки *in vitro*, а также специфически секретируют провоспалительные цитокины ИИФ-γ и ИЛ-2. (Б) Анализ репертуара Т клеточных рецепторов биоптата пациента #1 после ко-инкубации клеток пациента с CART клетками специфичными к TCR опухолевых клеток (P#1-CAR) и контрольных CART специфичных к TCR Jurkat (J-CAR). (В) Анализ терапевтической эффективности персонифицированных CAR Т клеток *in vivo*. Мышам линии NOD.SCID были внутривенно введены 0,5 млн. опухолевых клеток Jurkat, MOLT-4, либо Jurkat, несущих TCR опухолевых лимфоцитов пациента #1. Через 2 дня животным внутривенно вводили 5 млн. CAR Т клеток специфичных к TCR. (Г) Прижизненная визуализация динамики роста опухолевых клеток в терапевтических и контрольных группах.

Создание контролируемых химерных антигенных рецепторов.

Создание модульных (также называемых адаптерными или универсальными) химерных рецепторов – это одно из активно развивающихся направлений дизайна CAR в области увеличения безопасности адоптивной иммунотерапии. Современная адоптивная иммунотерапия CAR Т клетками включает введение пациенту живых клеток с существенным потенциалом к делению и активации. Эти процессы сложно контролировать

или быстро остановить. Длительная или избыточная активность CAR T клеток может привести к развитию синдрома выброса цитокинов (так называемый “цитокиновый шторм”), гиперактивации иммунной системы, истощению CAR T клеток, и, как следствие, недостаточной эффективности терапии и рецидиву опухоли. Также, разделение этапов распознавания и уничтожения опухолевых клеток с помощью адаптерных молекул позволяет настраивать чувствительность CAR T лимфоцитов к количеству опухолеассоциированного антигена на поверхности клеток и лучше дифференцировать опухолевые клетки от здоровых тканей.

Каталитические антитела были впервые описаны в 1980-х и обладают различными ферментативными активностями. Одно из таких антител, 38C2, катализирующее альдольные и ретро-альдольные реакции, было получено в результате иммунизации мыши 1,3-дикетоном с последующим получением гибридом. Данное антитело было использовано для создания регулируемых CAR (**Рис. 8А**) способных катализировать образование ковалентных связей с их субстратами (CovCAR T клетки). Благодаря ковалентной связи, образуемой между адаптером и 38C2, обеспечивается более стабильная и длительная активация CAR T-клеток в опухоли, особенно при понижении внутриопухолевого pH. Для изучения специфичности и активности CovCAR T клеток была использована линия клеток плоскоклеточной карциномы KB, которые имеют повышенную экспрессию рецептора фолиевой кислоты (Folate receptor, FR) (**Рис. 8Б**). Анализ экспрессии CovCAR и связывания CAR T клеток с конъюгатом 1,3-дикетона с FITC показал, что CovCAR(v2) является самым оптимальным вариантом химерного рецептора (**Рис. 8Г,Д**). Сравнение цитотоксичности CovCAR T клеток подтвердило данные проточной цитометрии. T клетки, модифицированные CovCAR(v1) и CovCAR(v2), специфически лизировали клетки KB при добавлении фолат-дикетона (**Рис. 8Е**). Для последующих экспериментов был выбран вариант CovCAR(v2), который далее будет обозначаться как CovCAR.

Для подтверждения возможности регуляции CAR T клеток с помощью каталитического антитела 38C2 проведен анализ активации и выброса провоспалительных цитокинов ИЛ-2 и ИНФ-гамма. В *in vitro* экспериментах показано, что CovCAR T клетки специфически и дозозависимо от концентрации низкомолекулярного адаптера лизируют клетки KB, но не A549 (**Рис. 9А**). Иммуноферментный анализ супернатанта через 24 часа выявил, что CovCAR T клетки секретируют ИЛ-2 и ИНФ-гамма только при наличии клеток, экспрессирующих рецептор фолиевой кислоты, а уровень цитокинов коррелирует с концентрацией фолат-дикетона (**Рис. 9Б**).

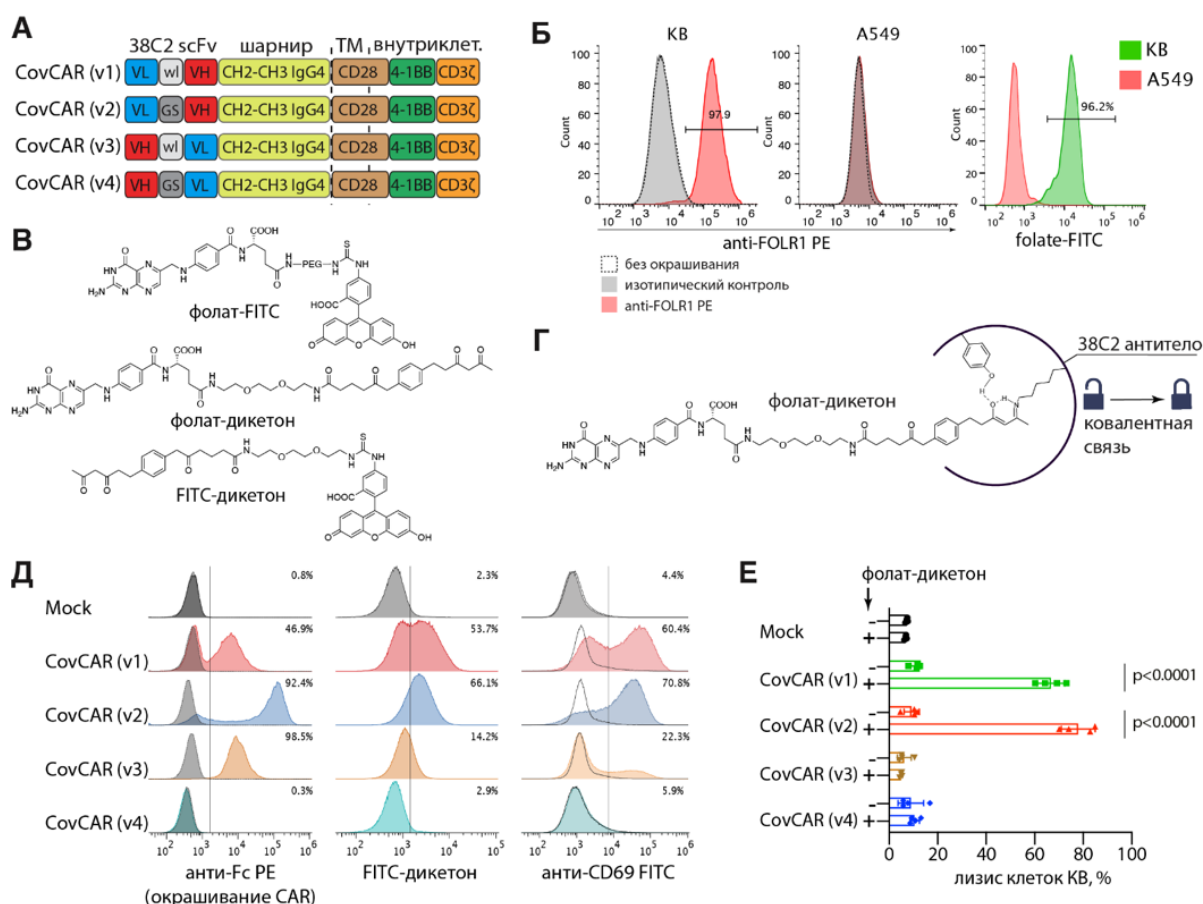


Рисунок 8 Создание и характеристика ковалентного CAR T клеточного рецептора на основе каталитического антитела 38C2. (А) Дизайн конструкции ковалентного CAR. (Б) Экспрессия фолатного рецептора на клетках KB и контрольных клетках A549. (В) Структуры соединений: флуоресцеин-фолат, флуоресцеин-дикетон и фолат-дикетон. (Г) Схема образующейся ковалентной связи между каталитическим антителом 38C2 и фолат-дикетоном. (Д) Сравнение уровня экспрессии и функциональной активности Т-клеток, трансдуцированных сконструированными ковалентными CAR (CovCAR). (Е) Сравнение цитотоксичности и неспецифического лизиса, индуцируемого CovCAR v1–v4 по отношению к клеткам KB при добавлении 25 нМ фолат-дикетона.

Для оценки терапевтического потенциала регулируемых CovCAR Т клеток мышам линии NSG (NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJl) подкожно вводили клетки KB-ffluc. Через 3 дня животным внутривенно вводили CovCAR Т клетки и фолат-дикетон. Визуализация люциферазного сигнала показала, что уже на 4-й день после введения CovCAR Т клеток и фолат-дикетона опухоль полностью эрадикаровалась (Рис. 9В). Объем опухоли значительно уменьшился по сравнению с контролем (Рис. 9Г). Выживаемость животных, получавших фолат-дикетон, была значительно выше контрольной группы (Рис. 9Д).

Далее, для расширения потенциальной области применения CovCAR Т клеток были получены адаптерные молекулы, направленные на PSMA (простатоспецифический мембранный антиген), высоко экспрессируемый на поверхности клеток рака предстательной железы. Наиболее известным низкомолекулярным лигандом PSMA

является соединение DUPA, широко используемое в качестве модуля для таргетной доставки терапевтических агентов и диагностики.

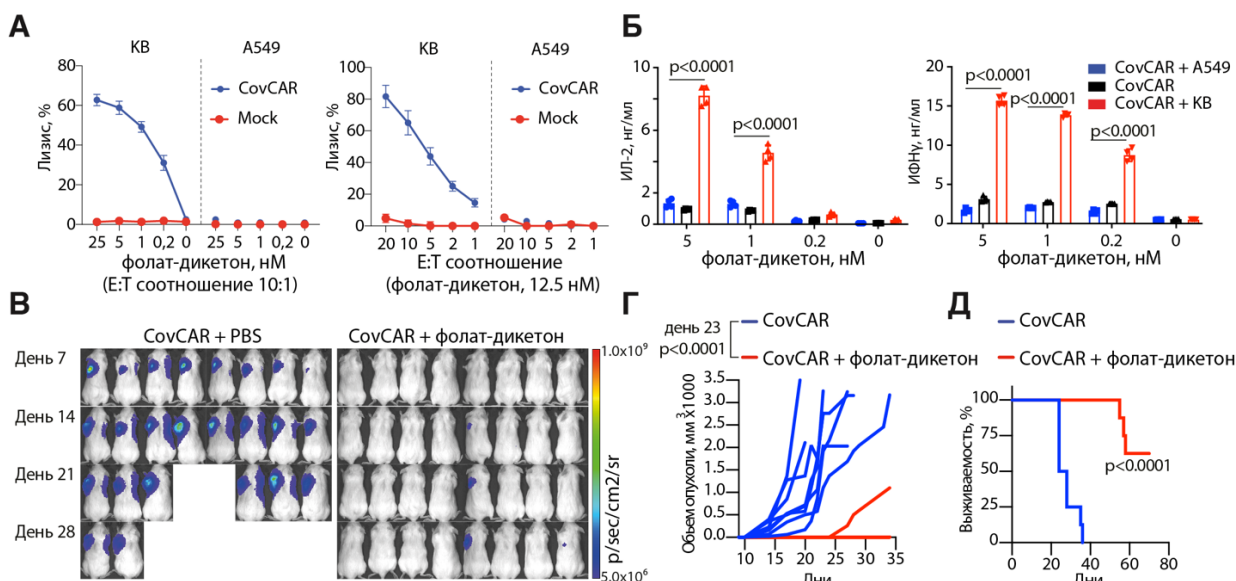


Рисунок 9 CovCAR T клетки элиминируют опухолевые клетки в присутствии низкомолекулярного адаптера фолат-дикетона *in vitro* и *in vivo*. (A) Влияние концентраций фолат-дикетона на цитотоксическую активность CovCAR T клеток. (Б) Зависимость секреции провоспалительных цитокинов CovCAR T клетками от концентраций фолат-дикетона. (В) Прижизненная визуализация опухолевых клеток KB-ffluc у животных, которым вводили CovCAR T клетки в комбинации с PBS или фолат-дикетоном. (Г) Индивидуальные кривые объема опухоли животных из контрольной и экспериментальной групп. (Д) Кривые выживаемости в группах.

Для оптимизации структуры бифункционального адаптера, который одновременно должен эффективно связываться с PSMA и формировать ковалентную связь с CovCAR был синтезирован ряд химических соединений на основе 1,3-дикетон и DUPA, содержащих линкеры различного типа и длины (DUPA-n-diketone) (Рис. 10А). Анализ лизиса клеток рака простаты (Рис. 10Б) и секреции провоспалительных цитокинов ИЛ-2 и ИНФ гамма показал, что соединения DUPA-3-дикетон, DUPA-4-дикетон и DUPA-5-дикетон оказались наиболее эффективными соединениями для контроля активности CovCAR T клеток (Рис. 10В,Г). Для определения терапевтического потенциала CovCAR T клеток *in vivo* были проведены эксперименты с использованием иммунодефицитных мышей линии NSG, которым ввели подкожно клетки PC-3 PSMA FFLuc. После введения CAR T клеток, животным трижды с перерывами в 9 дней внутривенно вводили увеличивающиеся с каждым раундом дозы соединений DUPA-3-дикетон, DUPA-4-дикетон и DUPA-5-дикетон (Рис. 11А). Динамику роста опухоли определяли путем прижизненной визуализации биолуминесценции (IVIS) и измерения объема опухоли животных из всех экспериментальных групп. Полученные данные показывают, что совместное введение CovCAR T клеток и соединений DUPA-дикетон эффективно подавляет рост опухоли или полностью уничтожает раковые клетки (Рис. 11Б,В,Г). Соединение DUPA-3-дикетон

оказалось самым эффективным и его введение привело к 100% выживаемости животных в группе в течение более 50 дней с момента введения CovCAR T клеток (Рис. 11Д).

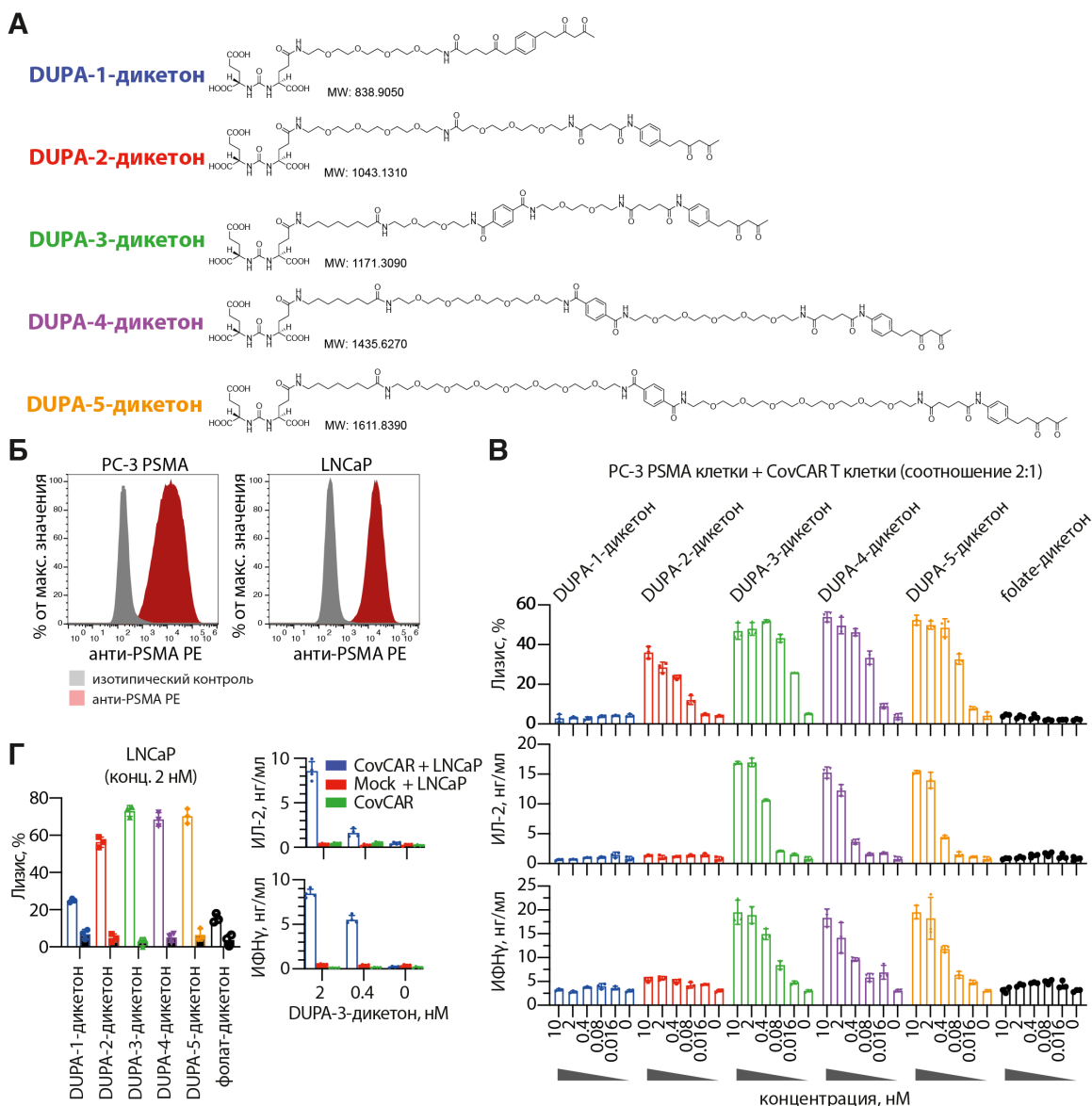


Рисунок 10 Синтезированные конъюгаты DUPA и 1,3-дикетона специфичные к PSMA и анализ их функциональной активности. (А) Химические структуры панели соединений DUPA с 1,3-дикетоном, содержащие линкеры различного типа и длины. (Б) Цитофлуориметрический анализ экспрессии PSMA клетками рака простаты PC-3 и карциномы LNCaP. (В) Анализ лизиса клеток рака простаты и выброса провоспалительных цитокинов ИЛ-2 и ИФН-γ при инкубации 38C2-CART клеток с таргетируемыми клетками PC-3 PSMA при различных концентрациях соединений DUPA-дикетон. (Г) Анализ лизиса карциномы и выброса провоспалительных цитокинов ИЛ-2 и IFN.

Далее мы подтвердили, что конъюгаты дикетонов позволяют контролировать эффективность и персистенцию CovCAR T клеток *in vivo* (Рис. 12). Для отслеживания модифицированных Т клеток после введения животным были получены CAR Т-клетки, ко-экспрессирующие CovCAR и люциферазу. Мышам линии NSG подкожно вводили 1×10^6

клеток PC-3 PSMA^{fluc} и через 12 дней животным вводили 10×10^6 CovCAR/ffluc T клеток. Через 6 часов животные начали получать внутривенные инъекции DUPA-3-дикетона в возрастающих концентрациях (Рис. 12А).

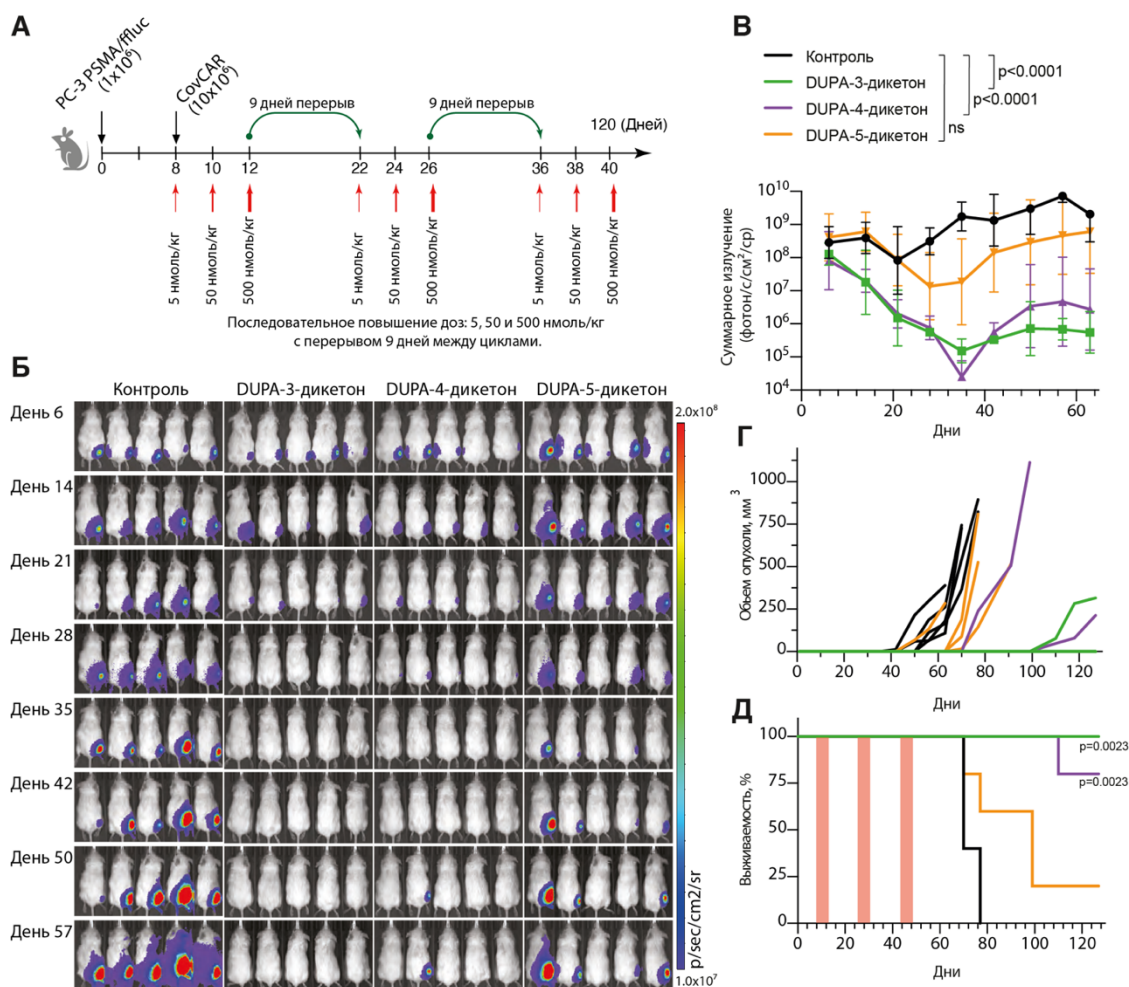
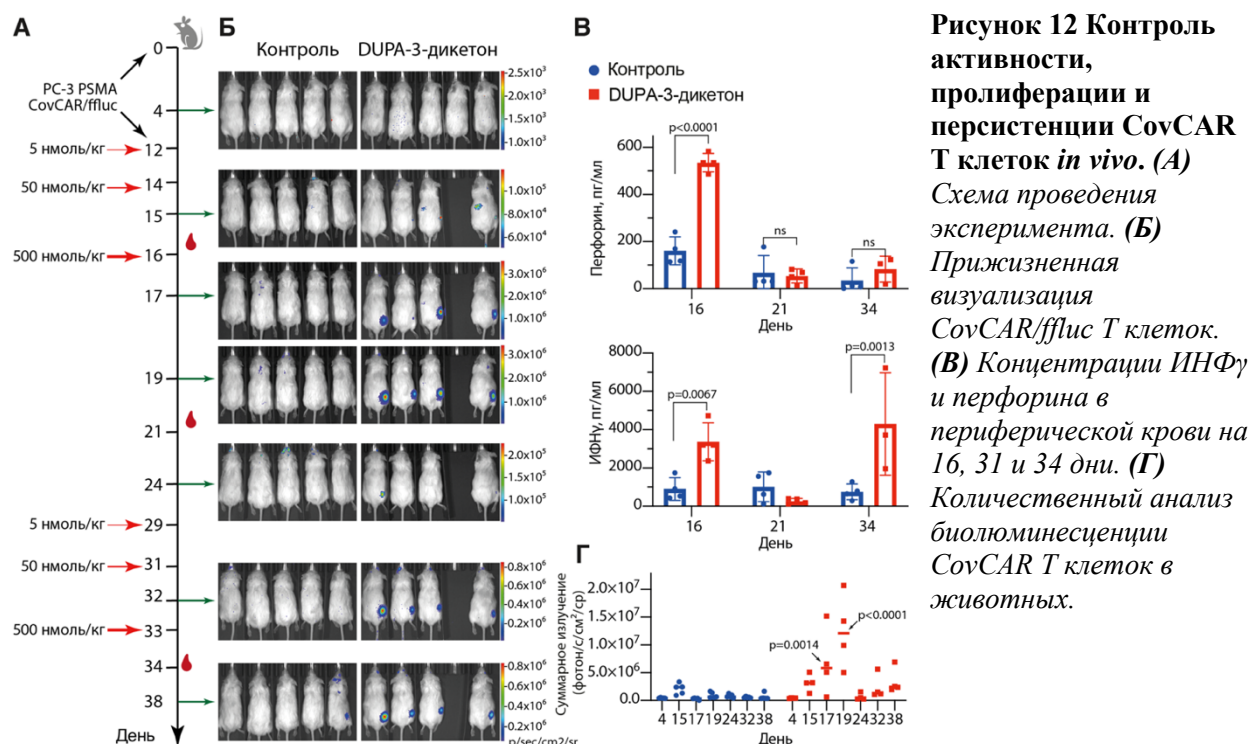


Рисунок 11 Анализ противоопухолевой активности CovCAR T клеток при введении соединений DUPA-дикетон в ксенотрансплантатной модели рака простаты. (А) Схема эксперимента. (Б) Прижизненная визуализация динамики роста опухоли у мышей из групп, получавших PBS, DUPA-3-дикетон, DUPA-4-дикетон и DUPA-5-дикетон. (В) Количественная оценка роста опухоли (люциферазной активности на мышь). (Г) Динамика роста опухоли у мышей контрольной и экспериментальных групп. (Д) Выживаемость животных из контрольной и экспериментальных групп.

Отслеживание сигнала биолуминесценции люциферазы CovCAR T клеток показало, что у животных, получавших DUPA-3-дикетон, CovCAR T клетки преимущественно локализуются в области опухоли и их количество коррелирует с циклами введения адаптерной молекулы (Рис. 12Б,Г). Уровни интерферона- γ и перфорина в сыворотке, измеренные на 16, 21 и 34 дни, также коррелировали с пролиферацией CovCAR T клеток и введением DUPA-3-дикетона (Рис. 12В,Г). Таким образом, полученные данные подтверждают возможность регулировать активность CovCAR T клеток *in vivo*.



Приведенные выше данные показывают, что при наличии лигандов (таких как фолат или DURA) можно создать низкомолекулярный адаптер для направления и контроля активности CovCAR T клеток. К сожалению, выбор таких соединений очень ограничен. Для поиска новых лигандов опухолевых антигенов была использована библиотека ДНК-кодированных химических соединений. Данный метод позволил объединить подходы комбинаторной химии и молекулярной биологии, сделав отбор органических соединений похожим на фаговый дисплей без необходимости индивидуального синтеза и анализа каждого соединения (Рис. 13). Отобранные соединения можно конъюгировать с 1,3-дикетоном и использовать в качестве низкомолекулярных адаптеров, направляющих активность CovCAR T клеток.

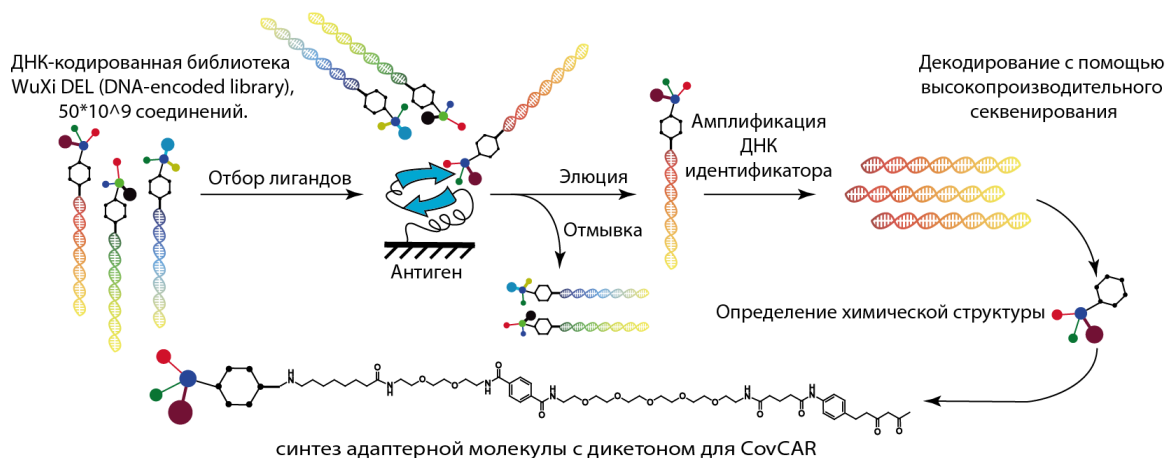


Рисунок 13 Поиск новых низкомолекулярных соединений аффинных к рецепторам опухолевых клеток с помощью скрининга ДНК-кодируемых библиотек химических соединений (DNA-encoded libraries, DEL).

Для поиска новых лигандов, специфически связывающихся с опухоль-ассоциированными антигенами PSMA (Рис. 14) и HER2 был проведен отбор соединений из библиотеки WuXi DEL. В результате высокопроизводительное секвенирование ДНК идентифицировало девять соединений потенциально специфичных к PSMA и шесть соединений специфичных к HER2 (Рис. 14А и Рис. 15А). Поверхностный плазмонный резонанс (SPR, Biacore S200) показал, что новые соединения взаимодействуют с рекомбинантным PSMA в наномолярном диапазоне (Рис. 14Б). Для направления активности CovCAR T клеток в состав отобранных органических соединений был добавлен линкер и 1,3-дикетон (Рис. 14В). Наиболее эффективной молекулой для адресной элиминации клеток рака простаты, экспрессирующих PSMA оказалось соединений DEL507 (Рис. 14Г,Д). Полученные данные показывают возможность поиска новых лигандов опухоль-ассоциированных антигенов с помощью ДНК-кодированных библиотек химических соединений и создания на их основе низкомолекулярных адаптеров, направляющих и контролирующей активность CovCAR T клеток.

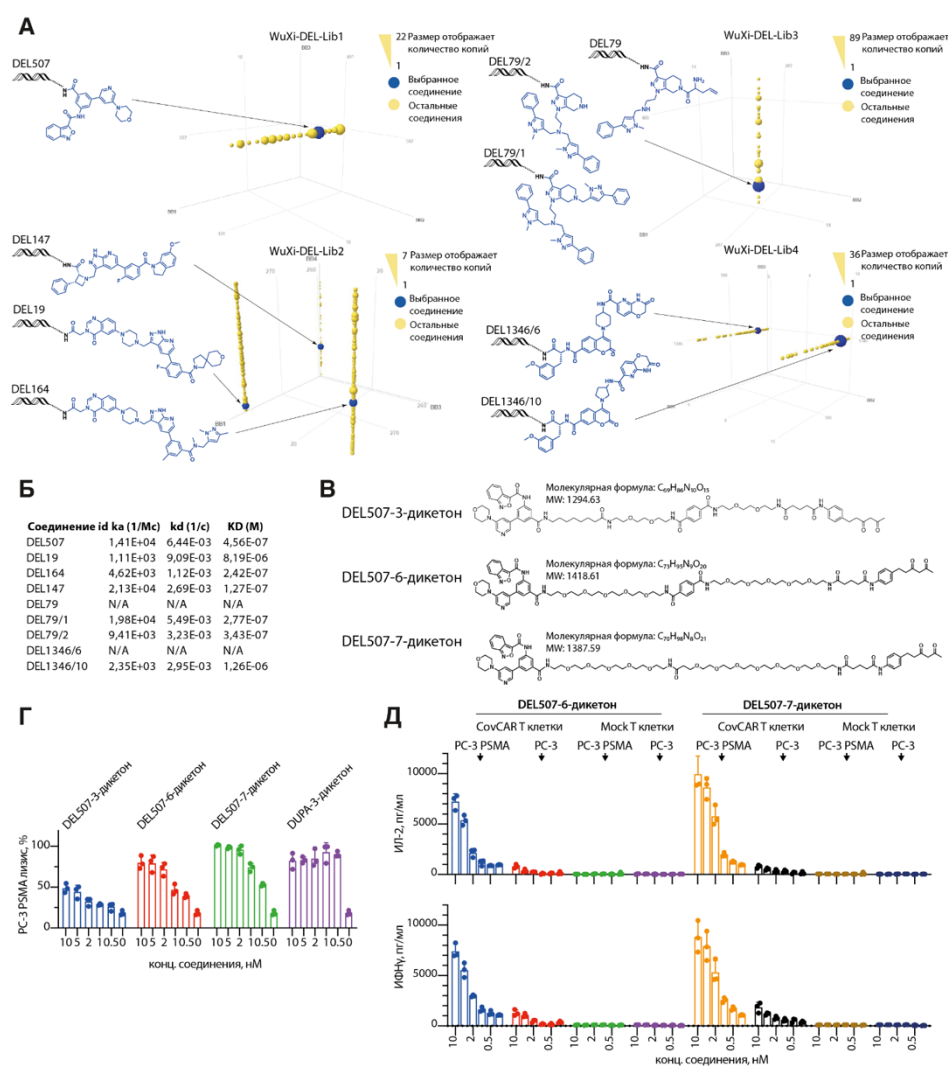


Рисунок 14 Скрининг ДНК-кодированной библиотеки химических соединений для поиска лигандов PSMA и создания адаптерных молекул для CovCAR. (А) Трёхмерная визуализация результатов отбора. Показаны идентифицированные структуры PSMA-связывающих соединений, отобранных из DEL-библиотек. (Б) Измерение константы связывания отобранных соединений с рекомбинантным PSMA. (В) Формула синтезированных соединений на основе DEL507, конъюгированных с дикетоном. (Г и Д) Влияние концентраций конъюгата DEL507-дикетон на высвобождение цитокинов и лизис раковых клеток CovCAR T-клетками.

Для создания регулируемых CAR и придания адаптерной молекуле дополнительных функций было предложено использовать молекулярную пару Барназа-Барстар, которые представляют собой уникальный пример молекулярного распознавания с высокой скоростью и сродством. РНКазы-Барназа были использованы для создания адаптерных молекул, а Барстар включен в состав CAR (BsCAR). Данная работа была проведена совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН под руководством академика Сергея Михайловича Деева (отдельно стоит отметить вклад Виктории Олеговны Шипуновой и Алексея Анатольевича Шульги). Богатый опыт лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН в области биотехнологии позволил получить панель адаптерных молекул, которые были цитотоксическими по отношению к опухолевым клеткам и сделали возможным контролировать специфичность, активность и чувствительность BsCAR Т клеток. Для создания адаптерных молекул специфичных к HER2 были использованы дарпин G3 и 9.29, слитые с барназой. Для оптимизации внеклеточного домена CAR была создана панель химерных рецепторов, содержащих короткие или длинные серин-глициновые линкеры и различные варианты барстара (дикий тип или мутантные формы C40A/C82A, I87E, C40A/C82A/I87E) (**Рис. 15А,Б**). Результаты окрашивания BsCAR Т клеток барназой, конъюгированной с FITC, а также анализ цитотоксичности BsCAR Т клеток в отношении клеток ВТ-474 при добавлении 1нМ адаптерных молекул показал, что наиболее эффективным вариантом BsCAR является v4 C40A/C82A с длинным серин-глициновым линкером (**Рис. 15В,Г**). Для подтверждения возможности регуляции CAR Т клеток на основе взаимодействия барназа-барстар был проведен анализ активации и выброса провоспалительных цитокинов ИЛ-2 и ФНО BsCAR Т клетками в зависимости от концентрации G3-барназа и 9.29-барназа. В экспериментах *in vitro* было показано, что BsCAR Т клетки специфически и дозозависимо от концентрации адаптеров G3-барназа и 9.29-барназа лизируют клетки ВТ-474 и секретируют провоспалительные цитокины ИЛ-2 и ИНФ.

Далее, с целью определения терапевтического потенциала регулируемых BsCAR Т клеток, мышам линии NCG (NOD.CBA-Rag1^{<null>}/Nju) подкожно вводили 2 миллиона клеток ВТ-474, экспрессирующих люциферазу светлячка (ВТ-474-Luc). Через 10 дней животным во всех группах внутривенно вводили 10 миллионов BsCAR Т клеток. После введения CAR Т клеток, животным проводили три цикла внутрибрюшинных введений увеличивающихся дозировок 9.29-барназа или G3-барназа (**Рис. 16А**).

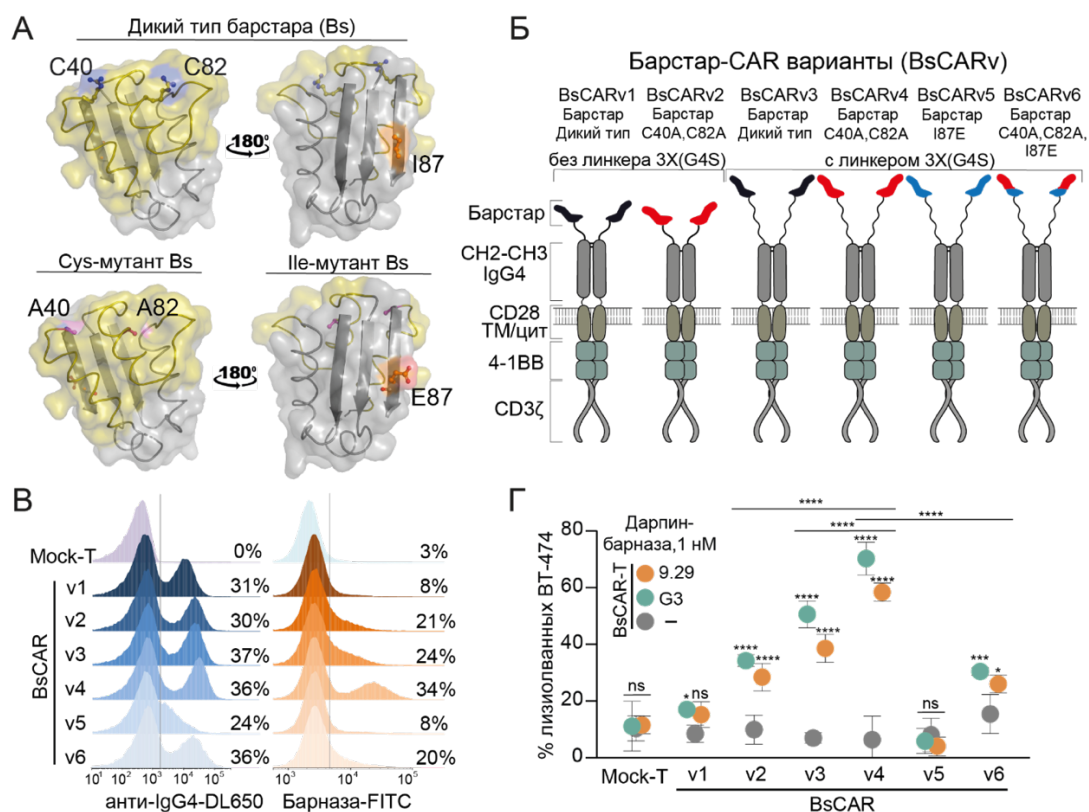


Рисунок 15 Создание и сравнение регулируемых BsCAR Т клеток на основе взаимодействия барназы с барстаром. (А) Структурная модель барстара, отмечены замененные остатки при создании вариантов BsCAR. Желтым цветом выделена область взаимодействия с барназой. (Б) Панель полученных вариантов BsCARv1-v6. (В) Анализ экспрессии вариантов BsCAR с помощью анти-IgG4 антитела конъюгированного с DL650. Анализ эффективности взаимодействия барстара в составе BsCAR с флуоресцентно меченной барназой. (Г) Сравнение цитотоксичности и неспецифического лизиса, индуцируемого BsCAR v1-v6 по отношению к клеткам BT-474 при добавлении 1 нМ G3-барназа, 9.29-барназа или без адаптера.

Как уже упоминалось ранее, такая схема терапии является оптимальной и обеспечивает корректную экспансию CAR Т клеток. Для наблюдения за динамикой роста опухоли был проведен анализ прижизненной визуализации биолуминесценции (IVIS) и измерение объема опухоли животных из всех экспериментальных групп (Рис. 16Б,В,Г). Полученные данные показывают, что совместное введение BsCAR Т клеток и адаптерных молекул 9.29-барназа или G3-барназа эффективно подавляет рост опухоли или полностью уничтожает раковые клетки. Соединение 9.29-барназа оказалось самым эффективным и привело не только к самому выраженному подавлению опухоли, но и повышенной инфильтрации CD8⁺ CAR Т клеток в сайт опухоли (Рис. 16Д).

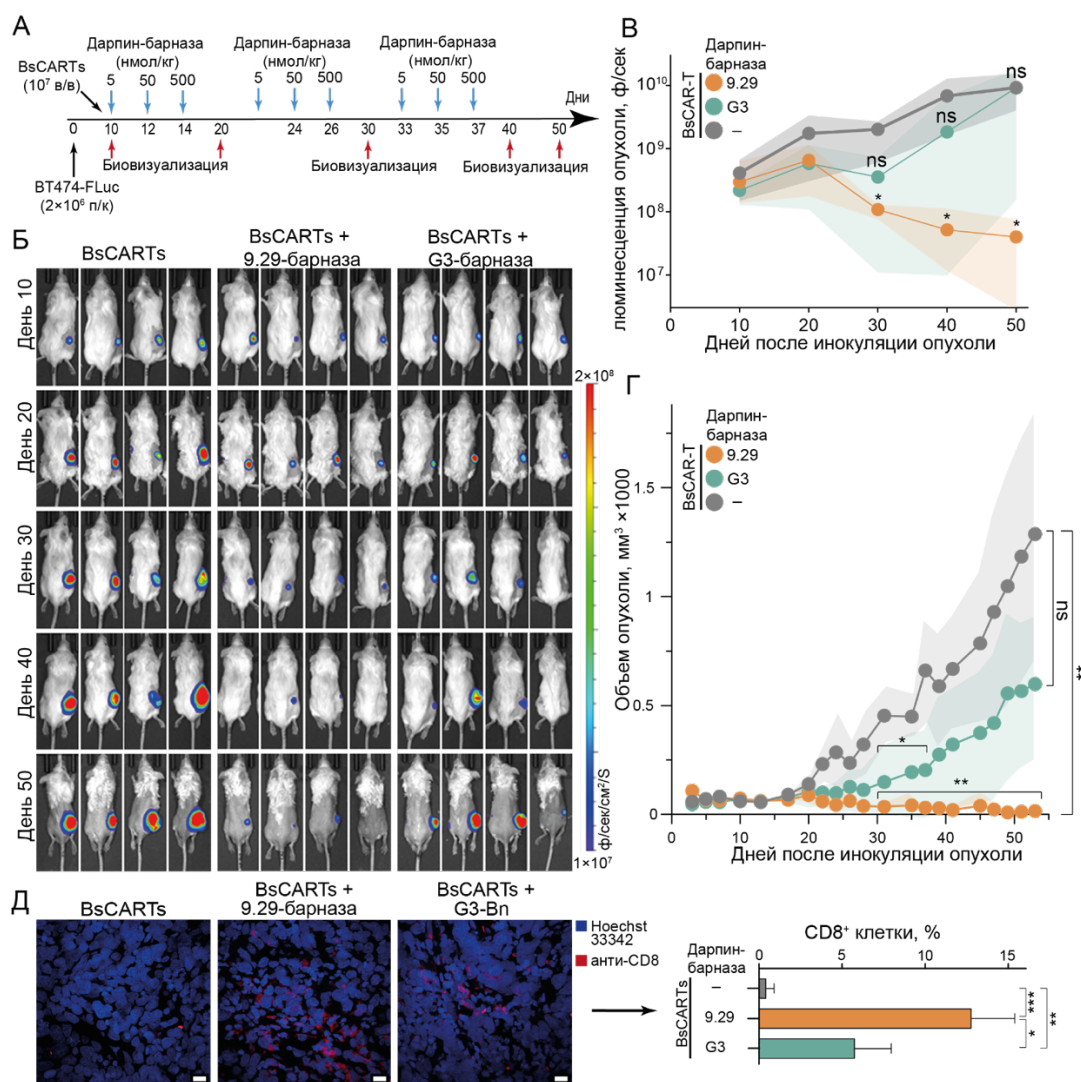


Рисунок 16 Анализ противоопухолевой активности BsCAR Т клеток и адаптерных молекул 9.29-барназа и G3-барназа в ксенотрансплантатной модели рака молочной железы. **(А)** Схема проведения эксперимента. **(Б)** Прижизненная визуализация динамики роста опухоли у мышей из групп, получавших Т клетки BsCAR отдельно или в сочетании с 9.29-барназой и G3-барназой. **(В)** Количественная оценка роста опухоли (люциферазной активности на мышшь). **(Г)** Динамика роста опухоли у мышей контрольной и экспериментальных групп. **(Д)** Репрезентативные иммуногистохимические изображения срезов опухоли, окрашенных антителами к человеческому CD8 (красный) и Hoechst 33342 (синий).

В результате, была показана принципиальная возможность создания регулируемых CAR Т клеток на основе взаимодействия ферментов и их природных ингибиторов. Данные адаптерные молекулы могут быть использованы в качестве отдельного соединения, обладающего противоопухолевой активностью или направлять и контролировать активность адоптивной иммунотерапии CAR Т клетками. Барназа может быть конъюгирована с различными направляющими молекулами, распознающими опухолевые антигены, что позволит расширить область применения BsCAR. Полученные данные показывают направление для расширения возможностей таргетирования опухолевых антигенов для солидных опухолей и увеличения безопасности применения CAR Т клеток.

Таргетирование пан-лейкоцитарного антигена CD45 и оптимизация эффекторной популяции для CAR T клеточной терапии гемопоэтических опухолей.

Несмотря на высокую эффективность аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, рецидив после алло-ТГСК остается основной причиной смертности у пациентов с острым В-клеточным лимфобластным лейкозом. С другой стороны, комбинированное введение CD19 CAR T клеток пациентам с В-ОЛЛ с рецидивом после алло-ТГСК приводило к полной ремиссии у 85,7–93,8%. В доклинических исследованиях уже продемонстрирована эффективная миелоабляция ГСК и клеток предшественников CAR T клетками, специфичными к CD117, CD33 и CD123. Выбор этих антигенов обоснован их минимальным уровнем экспрессии в немиелоидных тканях и отсутствием на зрелых Т лимфоцитах. В то же время, для более успешного кондиционирования и элиминации опухолей необходим антиген, охватывающий как можно больше гемопоэтических клеток, включая Т клетки, и отсутствующий на клетках остальных тканей. Для онкогематологических заболеваний уникальным антигеном является тирозиновая фосфатаза CD45, которая также известна как общий лейкоцитарный антиген, присутствующая на поверхности всех видов обладающих ядром клеток крови, включая злокачественно трансформированные, за исключением тромбоцитов и эритроцитов. Такие свойства делают CD45 уникальной мишенью для таргетной терапии, целью которой является уничтожение гемопоэза, особенно при кондиционировании пациентов перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Создание CAR T клеток специфичных к CD45 позволит объединить этапы кондиционирования пациента перед алло-ТГСК и терапией рака, что возможно обеспечит более глубокую элиминацию гемопоэтических клеток пациента и снизит вероятность рецидива после трансплантации. Основным препятствием к созданию CAR T клеток специфичных к CD45 является кросс-цитотоксичность CAR клеток по отношению к CD45 на поверхности Т клеток. Для получения устойчивых к аутоксичности клеток мы нокаутировали ген *PTPRC*, кодирующий CD45, с помощью CRISPR/Cas9 и гидовой РНК (gRNA) – GGGTTTAAGCCACAAATACA (gRNA2). gRNA2 обеспечивает в среднем 85% нокаутированной популяции при сохранении жизнеспособности. CD45^Δ Т лимфоциты детектировали с помощью проточной цитофлуориметрии (**Рис. 17А**), конфокальной микроскопии (**Рис. 17Б**), а также лизировали и анализировали присутствие CD45 методом вестерн-блоттинга (**Рис. 17В**) и секвенирования по Сэнгеру участка, где вносился разрыв (**Рис. 17Г**).

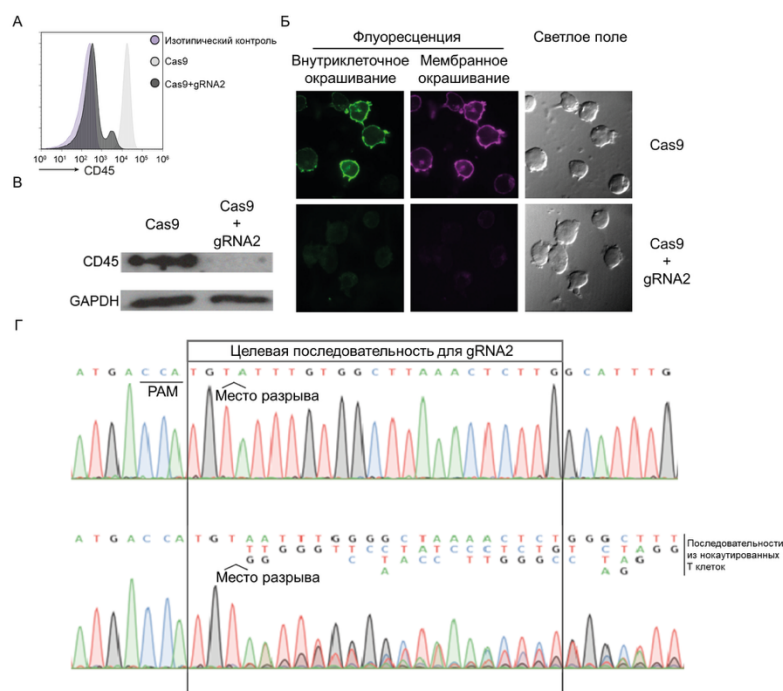


Рисунок 17 Анализ Т клеток после нокаута гена PTPRC.

(А) Проточная цитофлуориметрия. (Б) Конфокальная микроскопия. (В) Вестерн-блоттинг. (Г) Секвенирование продукта ПЦР, содержащего область узнавания gRNA2, по Сэнгеру; продукт ПЦР был получен амплификацией на матрице геномной ДНК Т клеток с отредактированным геномом; PAM (protospacer adjacent motif, на рисунке обозначена комплементарная PAM последовательность).

Как уже упоминалось в обзоре литературы, CD45 играет важную роль в активации и дифференциации Т лимфоцитов. Чтобы убедиться в функциональной активности CAR Т клеток после нокаута гена *PTPRC* был проведен ряд экспериментов с хорошо охарактеризованными CAR Т клетками, специфичными к CD19. Сравнительный анализ функциональной активности показал, что CD45^Δ CAR19 Т клетки лизируют опухолевые клетки Јеко-1 (лимфома мантийных клеток человека) с такой же эффективностью, как и обычные CAR19 Т клетки с нормальным уровнем CD45 (Рис. 18А). В свою очередь, анализ секреции провоспалительных цитокинов обнаружил меньшую продукцию провоспалительных цитокинов ИЛ-2 и ИНФ-γ CD45^Δ CAR19 Т клетками, по сравнению с CAR19 (Рис. 18Б,В). Таким образом, можно сделать вывод, что CAR Т клетки, в значительной степени, сохраняют функциональную активность в отсутствии CD45.

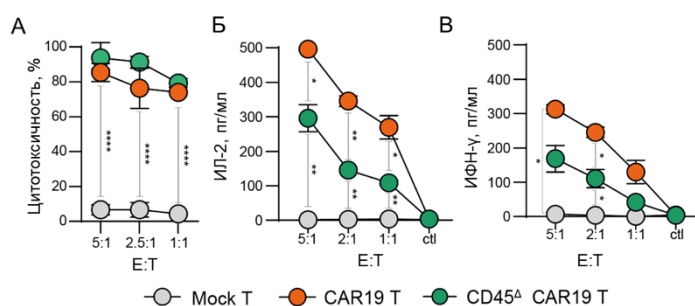
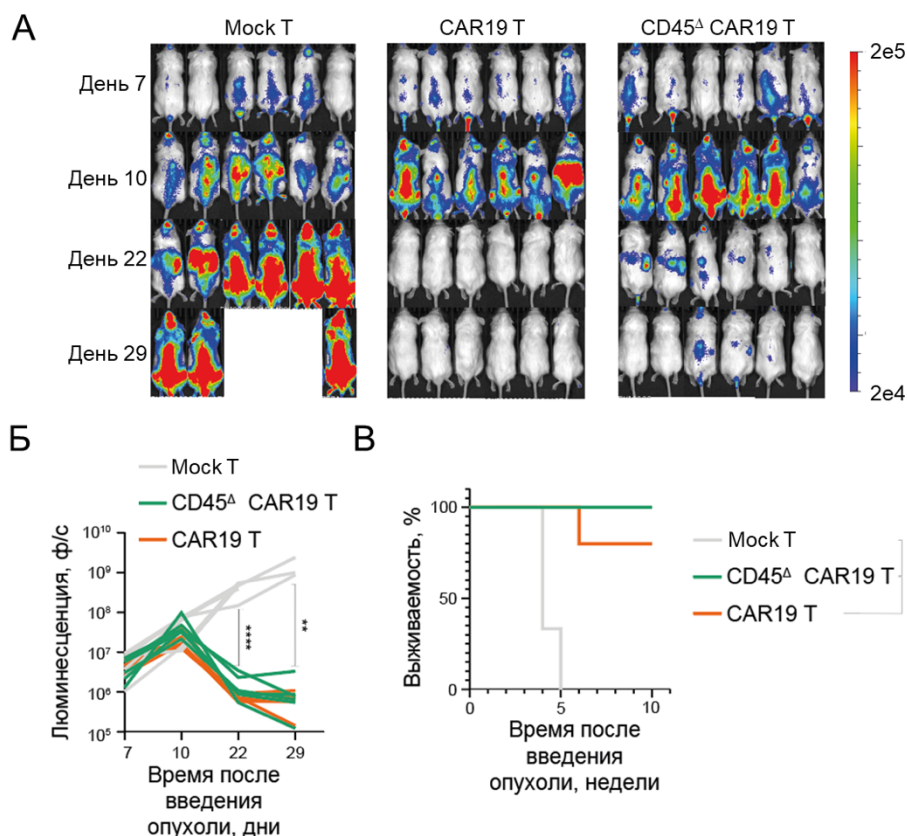


Рисунок 18 Сравнительный анализ активности CD45^Δ CAR19 Т клеток и CAR19 Т клеток.

(А) Цитотоксичность CD45^Δ CAR19 Т клеток и CAR19 Т клеток в отношении клеток линии Јеко-1 при различных соотношениях Е:Т. (Б и В) Анализ продукции провоспалительных цитокинов ИЛ-2 и ИНФ-γ Mock и CAR Т клетками.

Для подтверждения эффективности CD45^Δ CAR19 Т клеток *in vivo* мышам линии NCG внутривенно вводили 1 миллион клеток Nalm-6 ffLuc. Через 7 дней животным во всех

группах внутривенно вводили Mock, CAR19 или CD45^Δ CAR19 Т клетки. Для наблюдения за динамикой роста опухоли был проведен анализ прижизненной визуализации биолуминесценции (IVIS) животных из всех экспериментальных групп (Рис. 19А). CD45^Δ CAR19 Т клетки эффективно элиминировали опухолевые клетки *in vivo* (Рис. 19Б), что привело к лучшей выживаемости животных (Рис. 19В).



На основании полученных данных было решено создать и охарактеризовать CAR Т клетки специфичных к CD45 с нокаутом гена *PTPRC* (CD45^Δ CAR45). В качестве распознающего домена CAR45 был выбран scFv анти-CD45 антитела клон BC8. Для предотвращения аутоксичности CD45^Δ CAR45 Т клеток в процессе *ex vivo* экспансии, был использован обратимый ингибитор тирозиновых киназ широкого спектра действия дазатиниб. Сравнительный анализ цитотоксической активности показал, что CD45^Δ CAR45 Т клетки специфически лизируют CD45- положительные клетки (Jurkat, Jeko-1, THP-1) и не проявляют цитотоксической активности по отношению к клеткам без антигена (Nalm-6) (Рис. 20А,Б). Интересно, что анализе эффективности лизиса клеток Jeko-1 (которые имеют как CD45, так и CD19) в режиме реального времени CD45^Δ CAR45 Т клетки оказались более эффективными, чем обычные не-нокаутные по CD45 CAR19 Т клетки (Рис. 20В). При этом, при анализе секреции провоспалительных цитокинов, CAR45 Т клетки находятся в состоянии активации и вырабатывают ИЛ-2 и ИНФ-γ даже в отсутствии таргетных клеток

(Рис. 20Г). Полученные данные подтверждают, что CD45^Δ CAR45 T клетки эффективно лизируют CD45-позитивные опухолевые клетки человека *in vitro*.

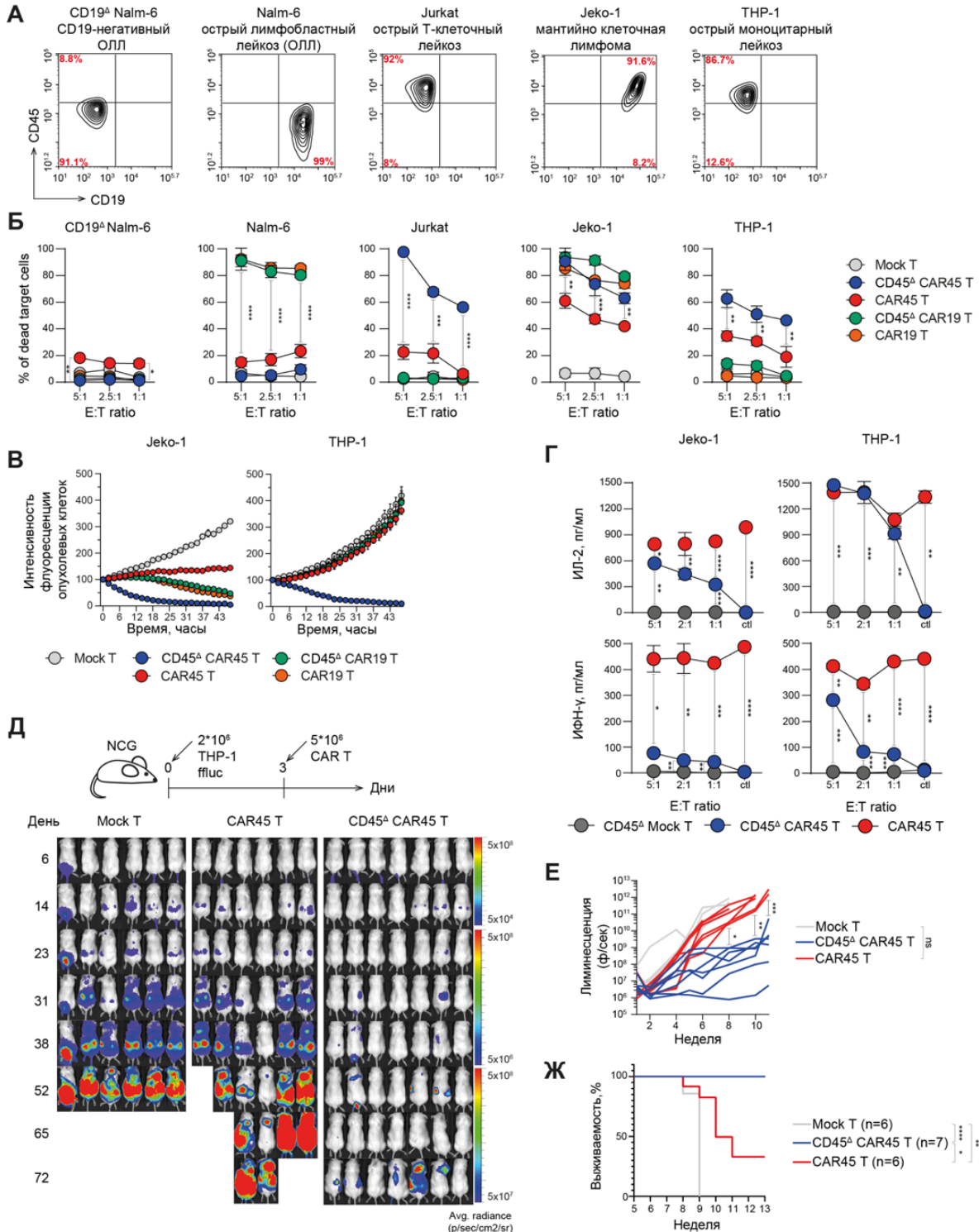


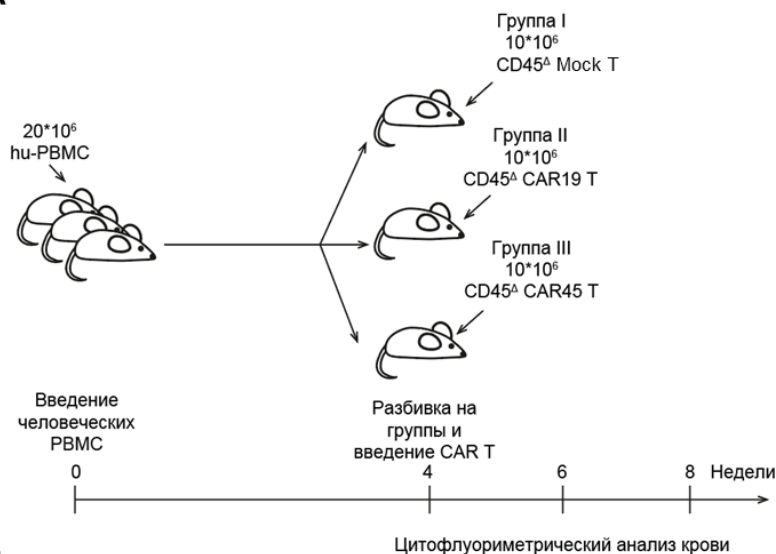
Рисунок 20 Противоопухолевая активность CD45^Δ CAR45 T клеток *in vitro* и *in vivo*.

(А) Экспрессия CD45 и CD19 опухолевыми клетками различной нозологии. (Б) Цитотоксичность CAR19, CD45^Δ CAR19, CAR45 и CD45^Δ CAR45 T клеток в отношении опухолевых клеточных линий из А). (В) Динамический анализ цитолиза опухолевых клеток Jeko-1 и THP-1 CAR T клетками. (Г) Анализ секреции провоспалительных цитокинов CD45^Δ CAR45 T клетками и CAR45 T клетками в присутствии различных таргетных опухолевых клеток. (Д) Схема эксперимента. (Е) Анализ эффективности CD45^Δ CAR45 T клеток в ксеногенной модели острого моноцитарного лейкоза. (Ж) Кривые выживаемости животных из контрольной и экспериментальных групп.

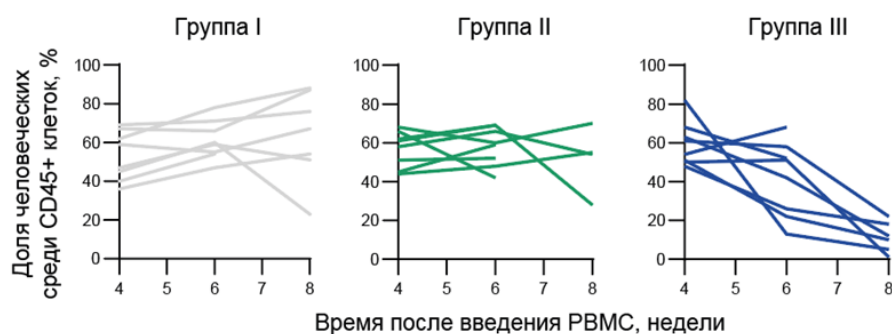
Чтобы изучить терапевтический потенциал CD45^Δ CAR45 Т клетки *in vivo* были проведены эксперименты на животных с ксеногенной моделью острого моноцитарного лейкоза, одной из самых востребованных и трудноизлечимых гематологических опухолей, которые плохо поддаются терапии CAR Т клетками. Мышам линии NCG внутривенно трансплантировали клетки THP-1 ffLuc/GFP и, после развития опухоли, вводили Mock Т клетки, CAR45 Т клетки или CD45^Δ CAR45 Т клетки (**Рис. 20Д**). Как видно из данных, представленных на **рисунке 4.20 Д и Е** CD45^Δ CAR45 Т клетки, но не CAR45 Т клетки, эффективно подавляют рост опухолевых клеток и существенно увеличивают выживаемость животных (**Рис. 20Ж**).

Для подтверждения возможности применения CD45^Δ CAR45 Т клеток для предтрансплантационной подготовки пациентов перед трансплантации гемопоэтических стволовых клеток были получены мыши с подсаженными PBMC пациентов. Иммунодефицитным мышам линии NCG проводили миелоабляцию тресульфаном и, на следующий день, вводили периферические клетки пациентов (аутологичные для CAR Т клеток) (**Рис. 21А**). Через 4 недели после трансплантации в крови животных методом проточной цитофлуориметрии определяли степень химеризма клеток крови (долю человеческих клеток среди всех CD45-позитивных клеток). Доля клеток пациента в среднем составляла 50%. Животных разделили на группы и вводили CD45^Δ Mock Т клетки, CD45^Δ CAR19 Т клетки либо CD45^Δ CAR45 Т клетки. Еженедельный анализ химеризма лейкоцитов показал, что CD45^Δ CAR45 Т клетки эффективно элиминируют PBMC пациентов (**Рис. 21Б,В**). Полученные данные подтверждают возможность элиминации CD45-позитивных клеток пациента CD45^Δ CAR45 Т клетками *in vivo*. В результате нами были получены устойчивые к аутоксичности CD45-специфичные CD45^Δ CAR45 Т клетки, которые продемонстрировали, что они эффективно элиминируют человеческие CD45-позитивные клетки крови, включая злокачественные, на релевантных животных моделях.

A



Б



В

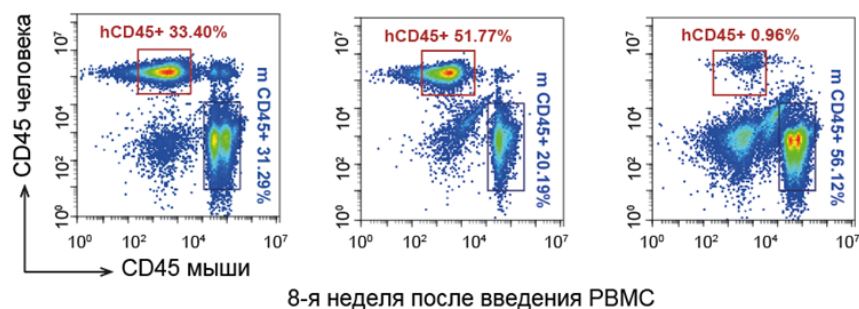


Рисунок 21 Анализ элиминации аутологичных PBMC пациентов CD45^a CAR45 T клетками in vivo.
(A) Схема эксперимента.
(Б) Изменение химеризма животных после введения CD45^a Mock T, CD45^a CAR19 либо CD45^a CAR45 T клеток.
(В) Анализ химеризма клеток крови мышей на 8 неделю после введения T клеток.

Изучение влияния факторов микроокружения опухоли на противоопухолевую активность CAR T клеток

Опухолевое микроокружение, обладающее иммуносупрессивными свойствами, создает серьезные препятствия для разработки новых терапевтических стратегий, основанных на адоптивной иммунотерапии, и CAR T терапия – не исключение. Активация и цитотоксичность T клеток, которые играют ключевую роль в адоптивной иммунотерапии, серьезно ограничены иммунологическими контрольными точками, наиболее важными из которых являются CTLA-4 и PD-1. Уровень этих негативных регуляторов – ингибиторов активации, существенно повышен на поверхности активированных, а особенно –

хронически активированных Т клеток. В настоящей работе для подавления взаимодействия PD-1 с PD-L1 было использовано наноантитело (VHH), специфичное к PD-1 человека, синтезируемое в CAR Т клетках. К гену, кодирующему анти-PD-1 антитело VHH, добавили последовательность короткого линкера и мотив PEBL (protein expression blockers). Внутри клетки анти-PD-1 VHH-PEBL связывается с PD-1 и препятствует его выходу на поверхность клетки (блокировка осуществляется на стадии транспорта белка через ЭПР и аппарат Гольджи). Итоговая лентивирусная генетическая рLV2 CAR19-P2A-aPD1-PEBL позволяет Т клеткам одновременно экспонировать на поверхности CAR19 и синтезировать внутриклеточный блокатор PD-1 (**Рис. 22А,Б**).

Для определения работоспособности созданной генетической конструкции были получены клетки Jurkat, со стабильно повышенным уровнем PD-1, названные Jurkat-PD-1. По данным, представленным на рисунке, отчетливо видно, что в результате трансдукции клеток Jurkat-PD-1 лентивирусами CAR19-P2A-aPD1-PEBL происходит увеличение на поверхности клеток CAR19 и одновременное снижение доли клеток с высоким уровнем PD-1 на мембране (**Рис. 22Б**).

Для количественной оценки активации под действием клеток мишеней линейных Т клеток были получены репортерные линии клеток Jurkat и Jurkat-PD-1 с геном люциферазы под контролем промотора, зависимого от фактора транскрипции NFAT (**Рис. 22В**). Анализ люциферазной активности показал, что клетки Jurkat CAR19 активировались в одинаковой степени независимо от экспрессии PD-L1 клетками Nalm-6. В свою очередь, при ко-инкубации клеток Jurkat-PD-1 CAR19 с Nalm-6-PD-L1 активность люциферазы в среде был значительно снижен (**Рис. 22В**). Результаты данного эксперимента показали, что внутриклеточное блокирование PD-1 позволяет преодолеть ингибирование сигнала, передаваемого через CAR, вызванного взаимодействием PD-1 с PD-L1. Сравнительный анализ CAR19-P2A-aPD-1-PEBL и CAR19 Т клеток показал сходную цитотоксическую активностью в первые дни эксперимента. Однако, при последовательном добавлении новых клеток-мишеней CAR19-P2A-aPD-1-PEBL Т клетки быстрее теряли цитотоксичность (**Рис. 23А**). Проточная цитофлуориметрия показала, что популяции CAR Т клеток с низким уровнем экспрессии PD-1 обогащена терминально дифференцированными клетками (**Рис. 23Б**). В составе популяции CAR19-P2A-aPD-1-PEBL Т клеток была повышена доля клеток с фенотипом клеток памяти эффекторного типа (ЕМ), в отличие от CAR19 Т клеток с нормальным уровнем PD-1. Кроме того, среди CAR19-P2A-aPD-1-PEBL Т клеток было существенно больше клеток с высоким уровнем TIGIT на поверхности (**Рис. 23В**).

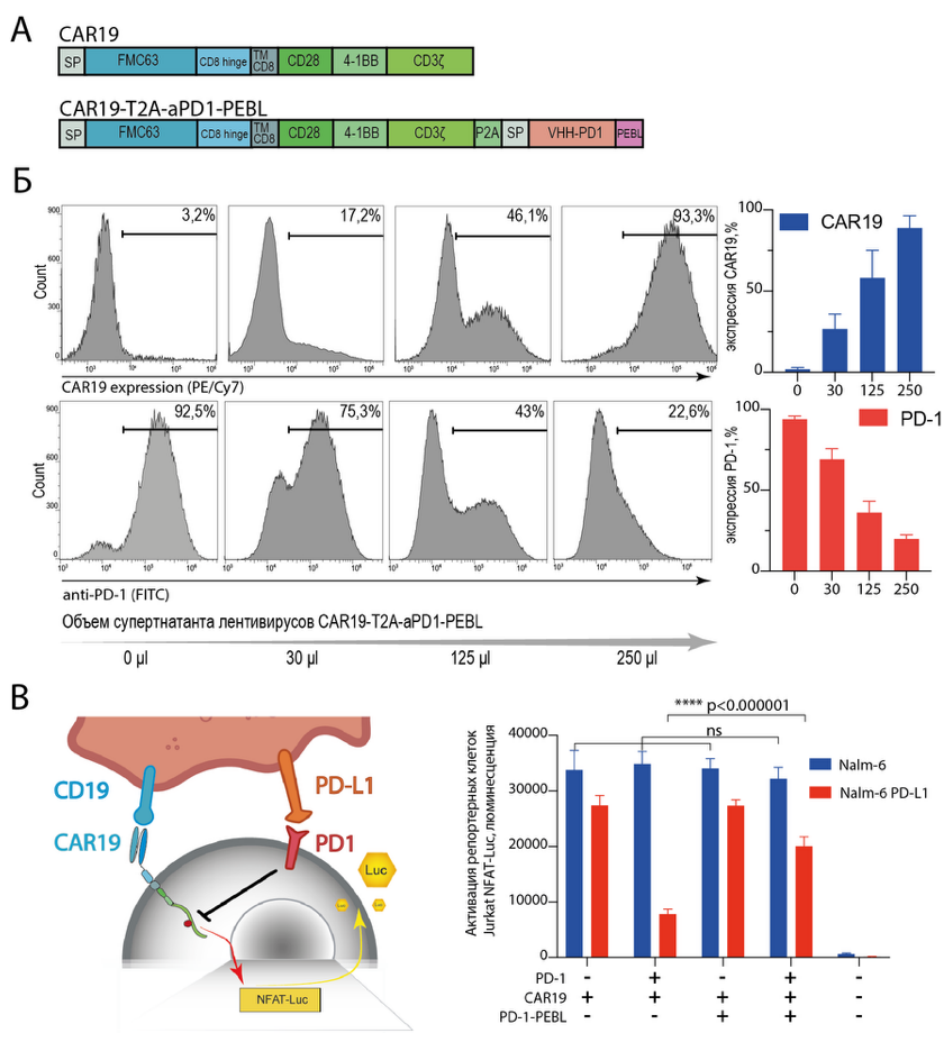


Рисунок 22
Получение и функциональный анализ конструкции CAR19-P2A-aPD-1-PEBL.

(А) Схема конструкций CAR19 и CAR19-P2A-aPD-1-PEBL.

(Б) Экспрессия CAR19 и PD-1 клетками Jurkat-PD-1 после трансдукции разными количествами лентивирусного супернатанта CAR19-P2A-aPD-1-PEBL.

(В) Репортерные клетки Jurkat и Jurkat PD-1 трансдуцировали CAR19 или CAR19-P2A-aPD-1-PEBL, а затем инкубировали с Nalm-6 и Nalm-6 PD-L1. Через 48 ч после начала инкубации супернатант собирали и анализировали люциферазную активность.

Как и в случае PD-1, увеличение уровня TIGIT на поверхности ассоциировано с функциональным истощением CAR T клеток, поэтому TIGIT относят к негативным регуляторам функций T клеток. Согласно полученным результатам, было выяснено, что удаление PD-1 с поверхности CAR T клеток, вопреки ожиданиям, вызывает повышенную активацию, быстрое созревание и функциональное истощение T клеток, которое приводит к снижению продолжительности цитотоксичности CAR T клеток. Вероятно, постоянная передача сигналов активации и пролиферации в CAR T клетках отличается от обычных T клеток. В результате CAR T клетки более чувствительны к стимулированию апоптоза в отсутствие сигналов, предоставляемых PD-1, который обычно ослабляет сильный сигнал через CAR. В итоге, как это ни парадоксально, оказалось, что отсутствие сигналов негативной регуляции на базальном уровне приводит к ухудшению выживаемости и значимому снижению функции CAR T клеток *in vitro*.

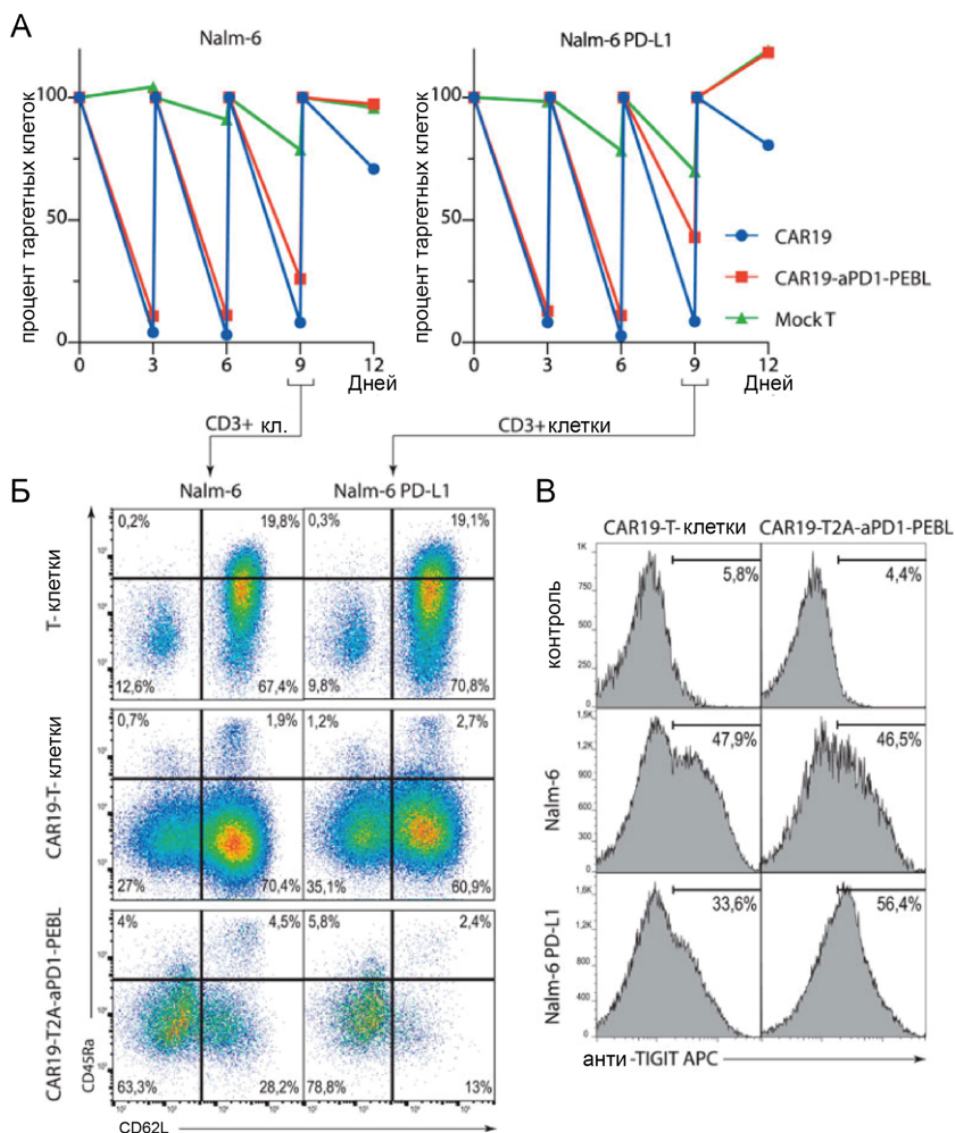


Рисунок 23
Внутриклеточное
блокирование PD-1 в
CAR T клетках
приводит к
повышенной
активации и
раннему истощению.
(А) Цитотоксический
 стресс-тест CAR19
 или CAR19-P2A-aPD-
 1-PEBL T клеток в
 отношении Nalm-6 и
 Nalm-6 PD-L1.
 Соотношение E:T 1:4,
 суммарная
 длительность
 эксперимента 12
 дней.
(Б) Фенотип CAR19 и
 CAR19-P2A-aPD-1-
 PEBL T клеток на 9-й
 день стресс-теста из
 А). **(В)** Экспрессия
 TIGIT CAR19 и
 CAR19-P2A-aPD-1-
 PEBL T клетками на
 9-й день стресс-
 теста.

Внеклеточные везикулы, выделяемые опухолями, являются важным фактором микроокружения, поскольку негативно влияют на функции клеток иммунной системы, ингибируя противоопухолевый иммунитет. Взаимодействие везикул-дериватов таргетируемых опухолевых клеток с CAR T клетками принципиально отличается от всех изученных ранее механизмов связывания и слияния везикул с клетками-мишенями. В случае, если опухолевые экзосомы несут антиген, к которому специфичен распознающий домен химерного антигенного рецептора, то CAR T клетки, вероятно, могут селективно и с очень высокой аффинностью связывать везикулы. Более того, неизвестно будет ли происходить активация CAR при связывании экзосом. В связи с этим, было решено исследовать взаимодействие CAR T клеток с опухолевыми везикулами, а также влияние этого взаимодействия на фенотип и функции CAR T клеток *in vitro*. Конфокальная микроскопия показала избирательное взаимодействие экзосом CD19+ и их поглощение клетками, экспрессирующими CAR19, но не контрольными Mock T клетками (**Рис. 24А**). Важно отметить, что данное взаимодействие является антиген-специфичным и обусловлено

связыванием CAR19 и CD19, так как экзосомы, полученные из клеток Nalm-6 с нокаутом гена CD19 не окрашивают CAR19 Т клетки (**Рис. 24Б**).

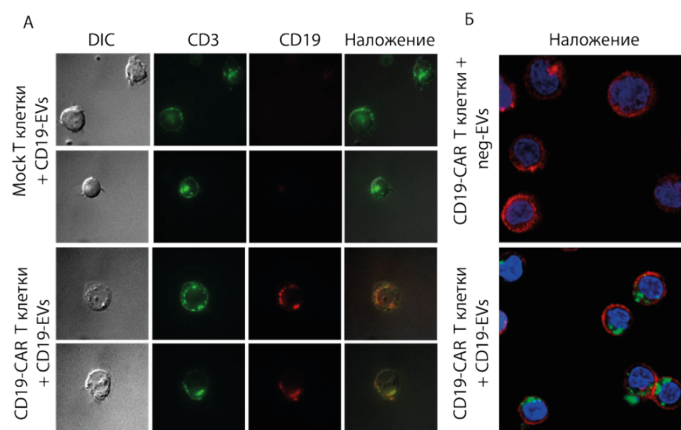


Рисунок 24 CAR Т клетки антиген-зависимо связывают опухолевые экзосомы.

(А) Конфокальное изображение клеток Mock и CAR19 Т клеток, инкубированных с экзосомами, секретируемыми клетками Nalm-6. (Красный - окрашивание антителами к CD19, зеленым – к CD3) (Б) CAR19 Т клетки связывают опухолевые экзосомы только при наличии CD19 (красн. CD3, зел. CD63-GFP, син. ядро (Hoechst33342)).

Распознавание антигена на поверхности опухолевой клетки инициирует активацию CAR Т клетки и приводит к секреции провоспалительных цитокинов (**Рис. 25А**), а также снижает цитотоксичность CAR19 Т клеток по отношению к клеткам-мишеням (**Рис. 25Б**). Культивация CAR Т клеток в присутствии CD19 или CD19/PD-L1 экзосом приводит к повышению маркеров истощения PD-1, CD57, TIGIT и смещению фенотипа в сторону терминально дифференцированных Т клеток (**Рис. 25В,Г**). Важно отметить, что добавление экзосом опухолевых клеток с нокаутом CD19 не оказывало подобного влияния на фенотип и пролиферацию CAR Т клеток. Ранее описанный тест “sequential killing” позволил определить, как долго популяция CAR Т клеток сохраняет свою цитотоксичность при добавлении опухолевых экзосом без CD19 (CD19-KO), с CD19 (CD19+) и CD19 вместе с PD-L1 (CD19+PD-L1+) (**Рис. 25Д**). Как и ожидалось, добавление CD19+ и CD19+PD-L1+ опухолевых экзосом приводило к быстрой потере функциональной активности CAR19 Т клеток.

Анализ транскриптома CAR Т клеток, обработанных везикулами, показал, что добавление CD19-положительных экзосом приводит к достоверному и значительному повышению экспрессии генов, регулирующих активацию Т клеток. Примечательно, что наряду с повышением экспрессии генов, прямо указывающих на активацию CAR Т клеток, таких как IL-5, ИЛ-2, CSF2, IL13, IFNG, IL21, IL10, NFAT5, наблюдается и увеличение транскриптов генов, задействованных в процессах функционального истощения и апоптоза активированных Т клеток. К ним относятся гены, кодирующие белки апоптотических путей, например FASLG, TNFRSF4, TNFRSF9, а также гены, кодирующие белки маркеров истощения, среди которых CD274 (PDL-1), CD273(PDL-2), CTLA-4. Вероятно, CD19, расположенный на поверхности везикул, стимулирует активацию CAR Т клеток, создавая

при этом благоприятные условия для поглощения опухолевых экзосом клетками. Это может привести к тому, что неидентифицированные компоненты опухолевых экзосом оказывают негативное воздействие на CAR T клетки, вызывая их функциональное истощение и гибель.

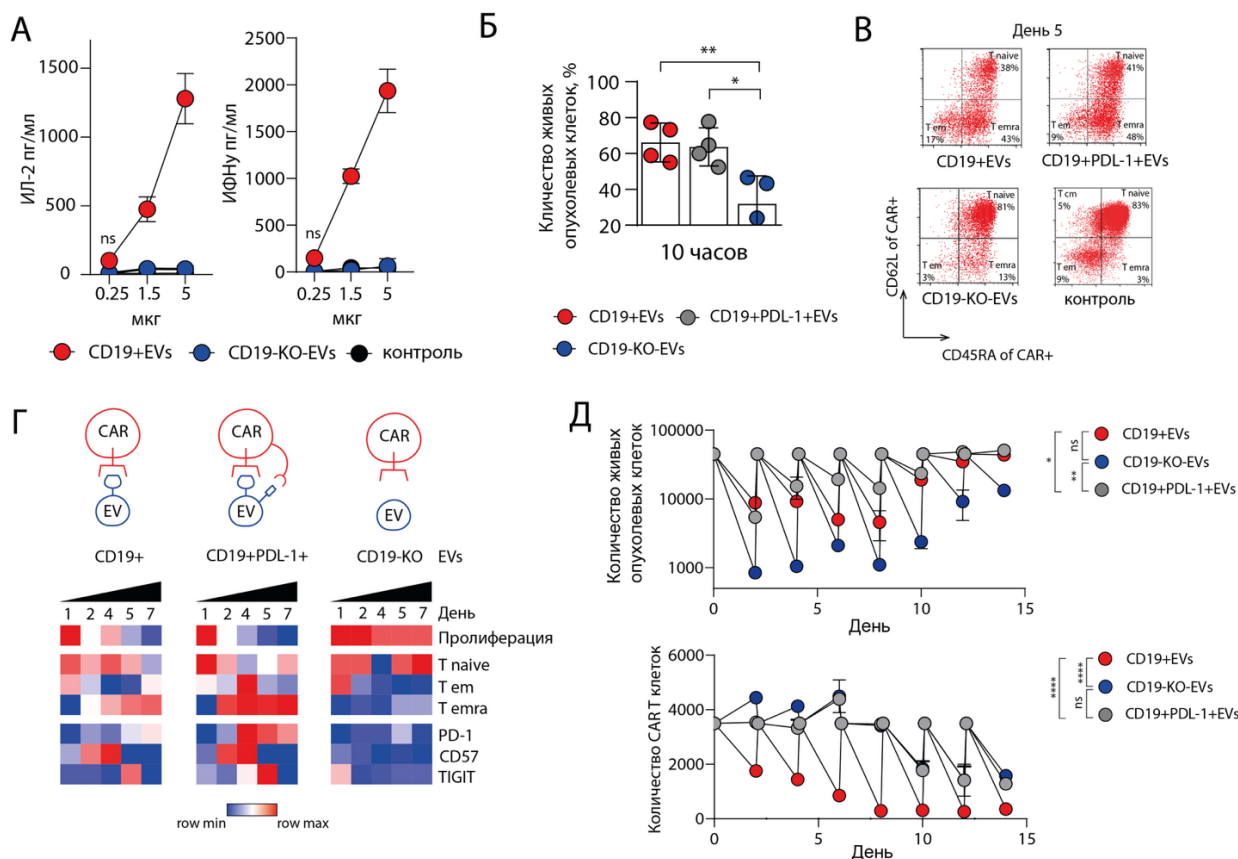


Рисунок 25. Влияние опухолевых экзосом на функциональную активность CAR T клеток. (А) Секретия про-воспалительных цитокинов при взаимодействии CAR19 T клеток с экзосомами, несущими CD19 (CD19+EV), или с экзосомами, лишенными CD19 (CD19-KO-EV); (ctl) – контроль, определяющий базовый уровень про-воспалительных цитокинов. (Б) Оценка цитотоксичности CAR19 T клеток, предварительно обработанных CD19+EV, CD19+PD-L1+EV и CD19-KO-EVs. (В) Анализ фенотипа CAR T клеток через пять дней после добавления CD19+EV, CD19+PD-L1+EV и CD19-KO-EVs. (Г) Анализ фенотипа и экспрессии маркеров истощения CAR T клетками после добавления опухолевых экзосом в течение семи дней. (Д) Добавление CD19+ и CD19+PD-L1+ опухолевых экзосом приводит к быстрой потере цитотоксичности и пролиферации CAR19 T клеток.

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

Результаты полученные при изучении взаимодействия внеклеточных экзосом опухолевых клеток с CAR T клетками привели нас к идее получения искусственных везикул, несущих опухолевые антигены CAR. В случае успешного применения такие антигенные везикулы можно будет использовать для *ex vivo* стимуляции клеток при создании CAR T клеточного продукта. Антиген-специфическая стимуляция позволит направленно поддерживать экспансию CAR T клеток и получать клеточный продукт клетки с более выраженным терапевтическим потенциалом. Совместно с сотрудниками

лаборатории биохимии нуклеиновых кислот под руководством чл.-корр. РАН Зенковой М.А. была разработана методика получения искусственных везикул (artificial vesicles, AV), предполагающая обработку клеток цитохалазином В. Цитохалазин В разрушает актиновый каркас клетки, что в свою очередь, вызывает экструзию ядра, отслоение плазматической мембраны и образование отпочковывающихся микроцитосфер из мембранных структур, которые освобождаются при встряхивании суспензии клеток. На поверхности микроцитосфер, должны располагаться белки, идентичные тем, которые присутствуют на мембране исходных клеток (**Рис. 26**).

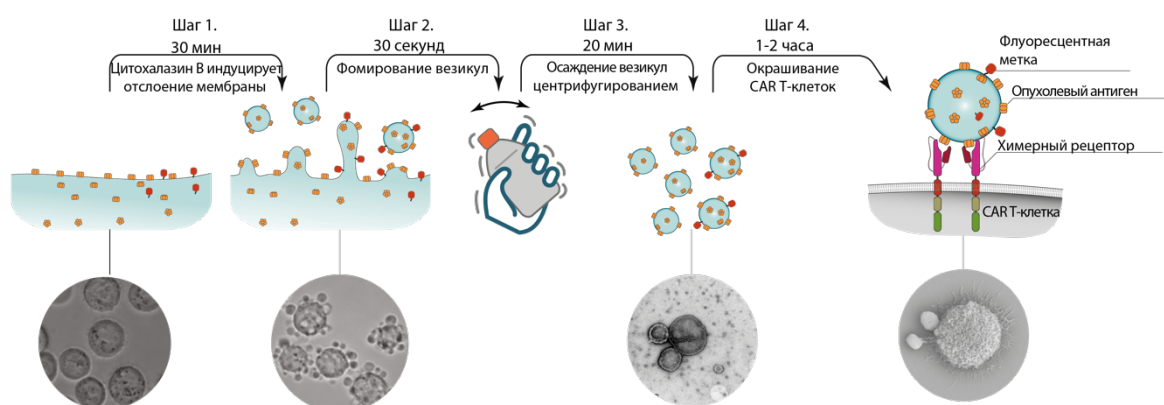


Рисунок 26 Схематическое изображение процесса получения искусственных везикул обработкой клеток цитохалазином В.

Получение AV, несущих антигены-мишени для CAR, потребовало создания линий клеток HeLa, предварительно стабильно модифицированных для сверхпродукции ряда опухолевых маркеров (CD33, CD123, CD19, IL13R2a, Her2). Для визуализации искусственных везикул по флуоресценции также были созданы стабильные клеточные линии, экспрессирующие флуоресцентный белок dTomato с трансмембранным якорем (dTomato-MTA). Визуализация каждого этапа формирования везикул осуществлялась с помощью конфокальной микроскопии (**Рис. 27А**). Анализ изображений трансмиссионной электронной микроскопии AV показал, что средний диаметр везикул составляет приблизительно 2400 нм (**Рис. 27Б**). Проточная цитофлуориметрия показала, что из одной клетки HeLa можно извлечь около четырех AV (**Рис. 27В**). Полученные везикулы оказались способными стимулировать CAR T клетки к секреции цитокинов (**Рис. 27 Г**).

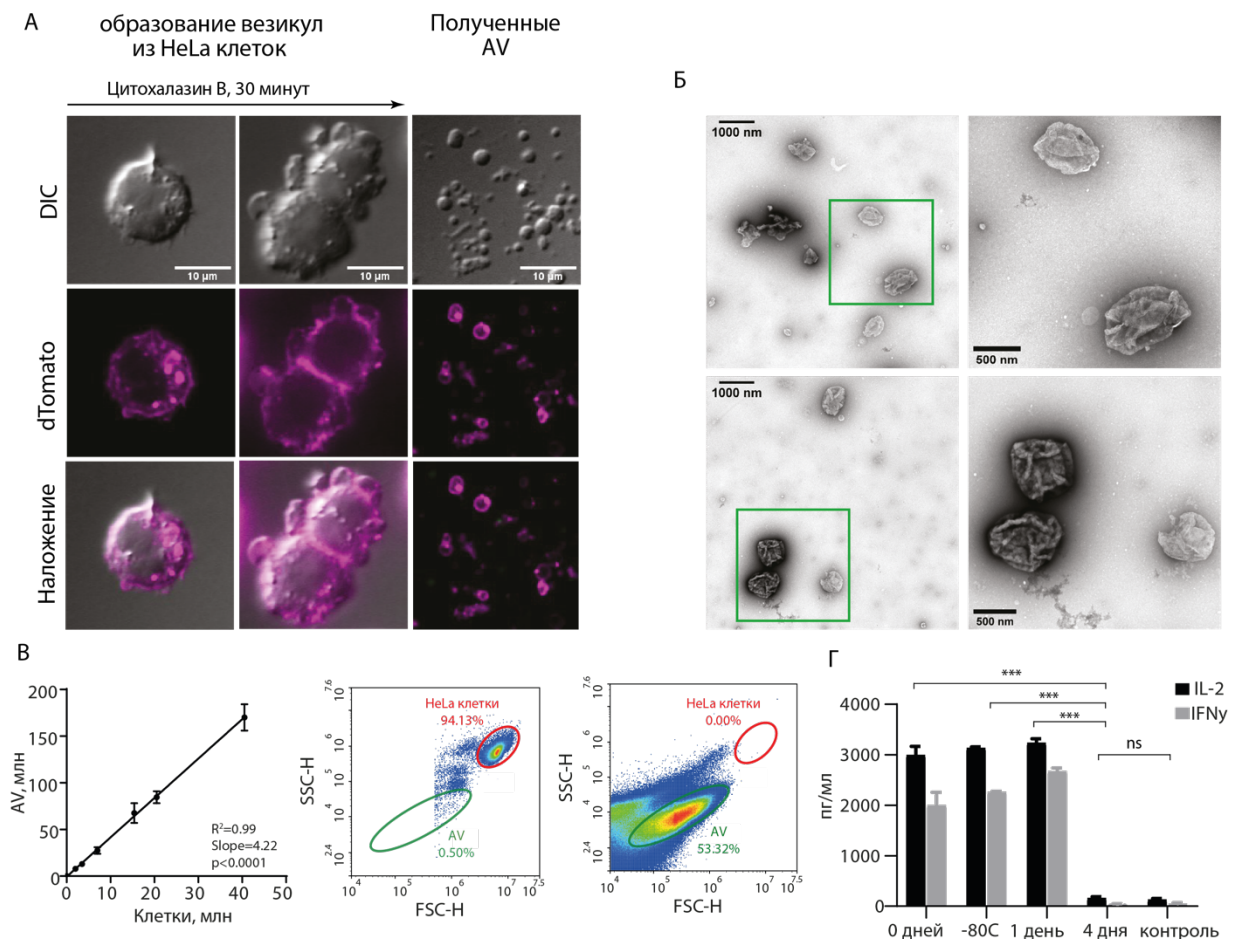


Рисунок 27 Получение и характеристика флуоресцирующих искусственных везикул AV. (А) Конфокальные изображения процесса формирования AV на мембране клеток HeLa-dTomato в ходе обработки цитохалазином В и последующей очистки. (Б) ТЭМ-изображения очищенных AV в разных масштабах. (В) График соотношения полученных AV и количества использованных клеток. (Г) ИФА анализ секреции ИНФ γ и ИЛ-2 клетками CAR19 Т клеток при культивации с CD19-AV. Искусственные везикулы хранили как при -80 °С, так и при +4 °С в течение нескольких суток. Показано сравнение секреции цитокинов Т клетками, которые стимулировали свежесыведенными, либо хранившимися в разных условиях и в течение разного времени AV. Данные представлены как средние значения с указанием стандартного отклонения.

Чтобы понять механизм взаимодействия искусственных везикул с CAR Т клетками, была использована конфокальная и сканирующая микроскопия CAR19 Т-клеток (а также Т клеток как отрицательного контроля) после их взаимодействия с CD19-AV (Рис. 28). Полученные данные свидетельствуют о том, что CD19-AV связываются исключительно с поверхностью CAR19 Т клеток. Снимки, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), демонстрируют, что везикулы округлой формы прикрепляются к мембране клеток при инкубации с ними или располагаются на выростах мембраны. Таким образом, полученные данные подтверждают специфическое связывание химерного антигенного рецептора на поверхности Т клетки и антигена на искусственных везикулах.

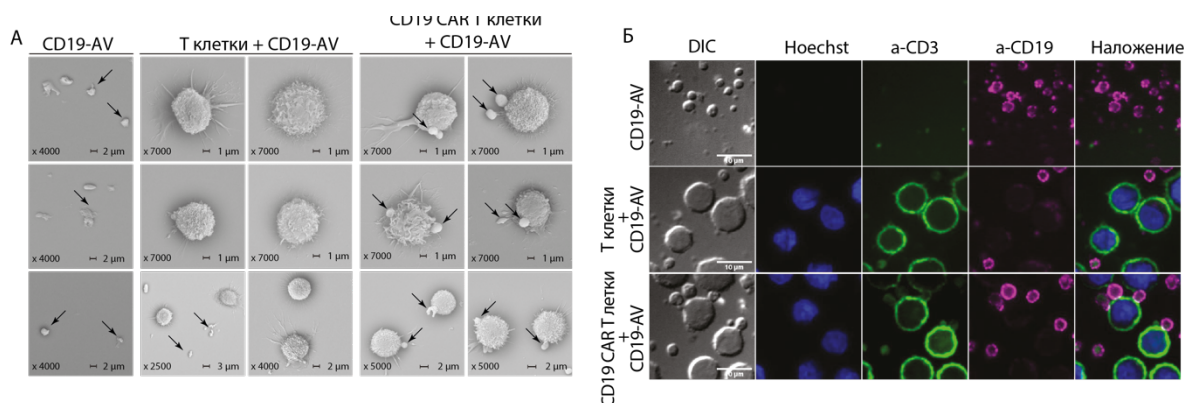


Рисунок 28 Сканирующая электронная и конфокальная микроскопия взаимодействия CAR T клеток с AV. (А) СЭМ контрольных и CAR19 T клеток после коинкубации с CD19-AV. Стрелки указывают на AV, прикрепленные к поверхности CAR T-клеток. (Б) Конфокальная микроскопия T- и CAR19 T клеток после инкубации с CD19-AV. Для детекции CD19 были использованы анти-CD19 антитела, конъюгированные с PE. Сигнал от mAb к CD19 показан пурпурным цветом, ядра были окрашены Hoechst 33342 (синий), а клеточная поверхность - mAb к CD3 человека (зеленый).

Способность AV активировать CAR была подтверждена при инкубации репортерных клеток Jurkat-CAR-NFAT-fluc с разными количествами AV (как с антиген-положительными, так и с антиген-отрицательными). Уровень сигнала увеличивался с повышением концентрации везикул, несущих опухолевые антигены, а контрольные AV не вызывали активации репортерных клеток (**Рис. 29А**). Для более детального изучения индукции эффекторной функции CAR T с помощью AV, в частности, продукции провоспалительных цитокинов ИНФγ и ИЛ-2, IL13CAR или CAR19 T клеток инкубировали с IL13Ra2-AV и CD19-AV, а также с контрольными везикулами, не содержащими антигена (**Рис. 29Б**), в различных соотношениях. Секреция провоспалительных цитокинов, индуцируемая распознаванием антигена, тесно связана с выбросом перфорина и гранзимов CAR T клетками. Проточная цитофлуориметрия показала дегрануляцию CAR T клеток, культивируемых с IL13Ra2-AV или контрольными AV (**Рис. 29В**). Для анализа влияния CD19-AV на цитотоксичность CAR19 T клеток использовали несколько подходов. В эксперименте использовали продукт CAR19 T клетки изготовленный из T клеток здоровых доноров, также клеток больных ОЛЛ. CAR19 T культивировали в присутствии CD19-AV в соотношении CAR T:AV 10 к 1 и 5 к 1 в течение четырех дней. Данные цитотоксических тестов показали, что способность T клеток убивать клетки-мишени значительно увеличивается при стимуляции CD19-AV. Данные динамики цитотоксичности (Incucyte анализ) подтверждают, что предварительная кратковременная инкубация с AV усиливает эффекторную функцию CAR T клеток.

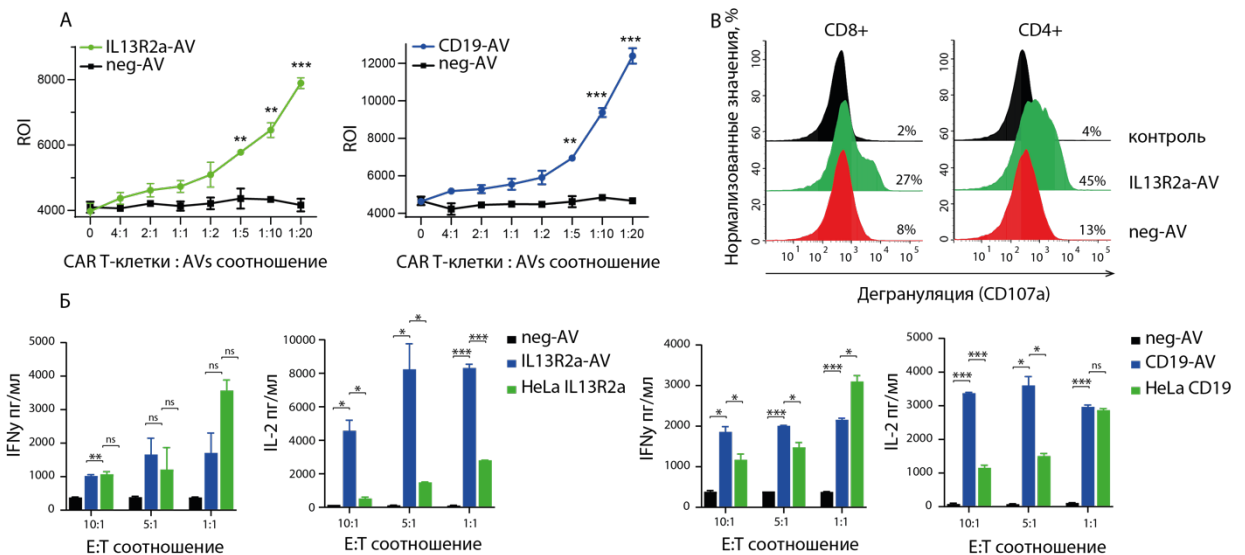


Рисунок 29 Искусственные везикулы антиген-зависимо активируют CAR T клетки. (А) Анализ активации Jurkat-NFAT-luc CAR T клеток при добавлении AV или контрольных антиген-отрицательными везикулами при различных соотношениях. (Б) Анализ секреции ИФН γ и ИЛ-2 IL13-CAR или CAR19 T клетками, культивированными при различном соотношении CAR T: AV (E:T). (В) Оценка дегрануляции IL13-CAR T клеток через 4 часа после добавления IL13R2a-AV или контрольных AV.

В экспериментах по “sequential killing” уже к 3-му дню эксперимента стало отчетливо заметно различие в эффективности между CAR19 T клетками, инкубированными с CD19-AV и контрольными AV. Через девять дней с момента начала эксперимента CAR19 T клетки с контрольными AV теряли цитотоксичность и погибали. В то время как, T клетки, стимулированные CD19-AV, сохраняли свою цитотоксичность и способность к пролиферации в течение 21 дня культивирования с клетками-мишенями Jeko-1 (Рис. 30). Таким образом, AV обладают способностью не только активировать CAR T клетки, но и обеспечивать их длительное пролиферацию и сохранение цитотоксичности, превосходя в этом стандартные методы стимуляции с помощью рекомбинантных цитокинов или фидерных клеток.

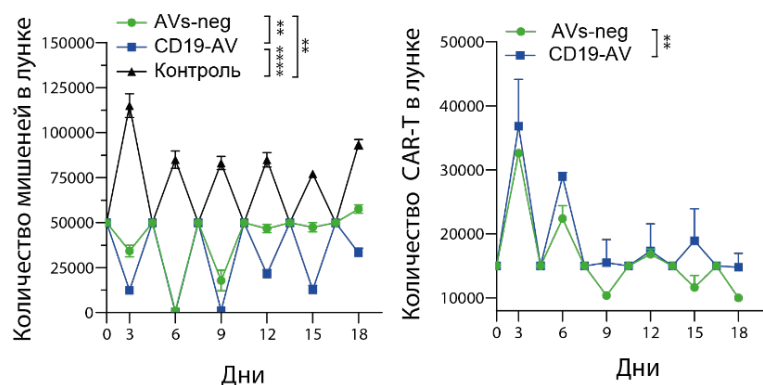


Рисунок 30 Результаты теста sequential killing клеток-мишеней CAR19 T клетками, обработанных CD19-AV или контрольными везикулами.

Следующей задачей было определить, можно ли использовать AV для стимуляции и культивирования CAR T клеток. CD19-AV и контрольные neg-AV везикулы были добавлены к CAR19 T клеткам, меченными CFSE. Анализ разбавления сигнала CFSE показал, что в группе neg-AV не наблюдалось увеличения популяции CAR T клеток, тогда как при инкубации с CD19-AV скорость размножения и рост CAR19 клеток были сопоставимы со стимуляцией ИЛ-2 (Рис. 31А). Аналогичный эксперимент с IL13-CAR и IL13R2a-AV показал постепенное увеличение CAR-положительной популяции с 22% на 1 день до 55% на 7 день, в то время как в контрольных образцах доля CAR-положительных оставалась практически неизменной (Рис. 31Б). Эти результаты свидетельствуют о высокой эффективности антиген-экспрессирующих AV для специфической активации и экспансии CAR T клеток.

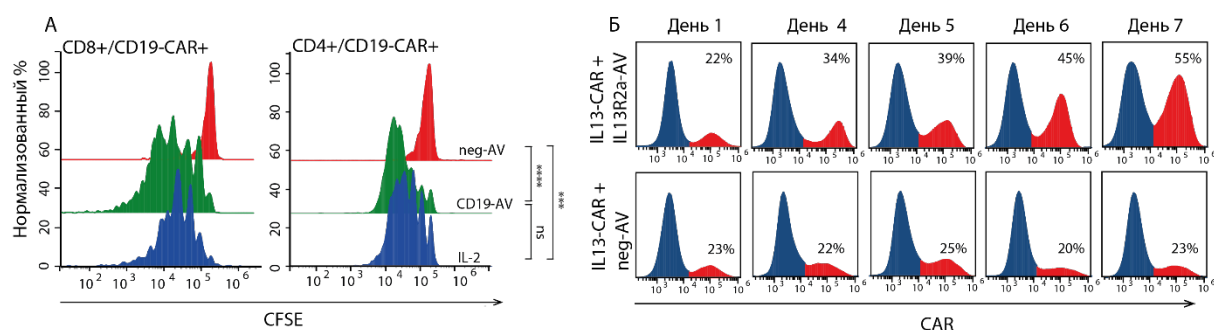
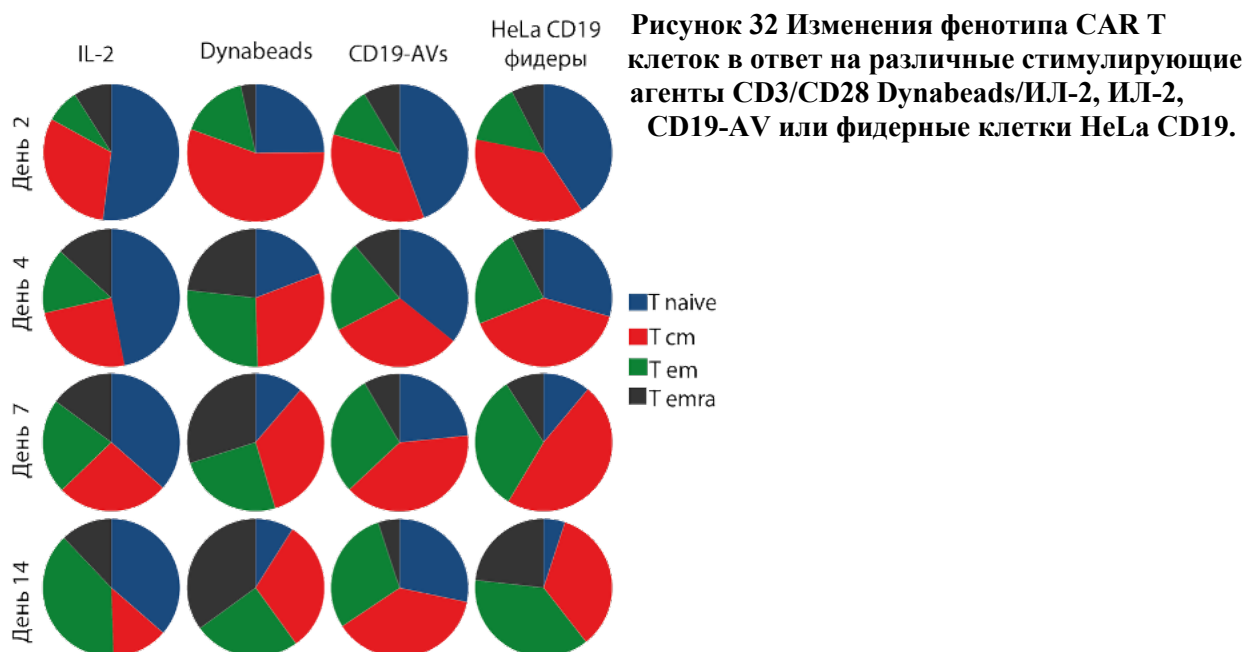


Рисунок 31 Экспансия CAR T клеток в присутствии AV. (А) Анализ экспансии CAR19 T клеток, меченных CFSE. Клетки культивировали в присутствии ИЛ-2, CD19-AV или контрольных AV в соотношении 5:1 в течение 4 дней. (Б) Увеличение процентного содержания IL13-CAR T клеток, которые культивировали в присутствии IL13R2a-AV или контрольных AV (neg-AV) в соотношении 5:1 в течение 7 дней. Значения на графиках показывают долю CAR T-клеток в суспензии.

Хроническая стимуляция CAR T-клеток неизбежно приводит к их истощению и гибели в результате активной пролиферации. Получение эффективного CAR T клеточного продукта предполагает различные стратегии, направленные на поддержание эффекторного потенциала и замедление процесса истощения. Однако исходная неоднородность клеточного состава донора может существенно затруднить эту задачу, что в конечном итоге снижает эффективность CAR T клеточной терапии. Исследование влияния AV на фенотип CAR19 T клеток может пролить свет на вопрос о том, не приводят ли AV к истощению T клеток при создании CAR T-клеток. Для этого были проанализированы маркеры истощения и дифференцировки T клеток у CAR19-T клеток, активированных различными стимуляторами, включая CD19-AV. В данном эксперименте использовали следующие условия стимуляции CAR T-клеток: CD3/CD28 Dynabeads в присутствии ИЛ-2 использовали как альтернативный, антиген-независимый вид стимуляции T клеток через TCR; добавление в среду ИЛ-2, как стандартный метод, использующийся для экспансии

CAR T-клеток; CD19-AV – искусственные везикулы, экспрессирующие маркер CD19; фидерные клетки HeLa CD19. Изучение фенотипа CAR T клеток при стимуляции CD19-AV выявило, что T клетки сохраняют свойство T_{naive} и T_{cm}. В противоположность этому, стимуляция Dynabeads/ИЛ-2 или фидерными клетками создавала условия для преобладания клеток T_{em} и T_{emra} (Рис. 32).



Для оценки терапевтического потенциала CAR19 T клеток, полученных с использованием CD19-AV, мышам линии NCG внутривенно вводили 1 миллион клеток Nalm-6-ffluc (рис. 33А). После того, как опухоли стали детектируемы (на 6 день), животных распределили на три экспериментальные группы случайным образом, каждая из которых получала определенный тип T клеток: контрольные T клетки (Mock-T), CAR19 T клетки, полученные с помощью CD19-AV, или CAR19 T клетки, выращенные с использованием ИЛ-2. Прогрессирование опухоли отслеживали каждые 4 дня путем интраперитонеального введения D-люциферина и последующей визуализации люминесценции в тканях мыши с помощью системы IVIS. К 14-му дню после трансплантации CAR T-клеток, полученных в присутствии ИЛ-2 или CD19-AV, опухоли практически исчезли, в отличие от контрольной группы (рис. 33А,Б). Через 19 дней у мышей, которым вводили CAR19 T клетки наблюдалось возобновление опухолевого роста, в отличие от группы, где использовались CAR19 T клетки, стимулированные AV, у которой сохранялась длительная ремиссия. Мыши, получавшие CAR19 T клетки, независимо от того, были они активированы ИЛ-2 или AV, демонстрировали аналогичную продолжительность жизни, которая значительно превосходила выживаемость мышей, получивших контрольные Mock T клетки (рис. 33В).

В целом, можно утверждать, что искусственные везикулы AV, несущие антигены, повышают эффективность CAR T клеточной терапии *in vivo*.

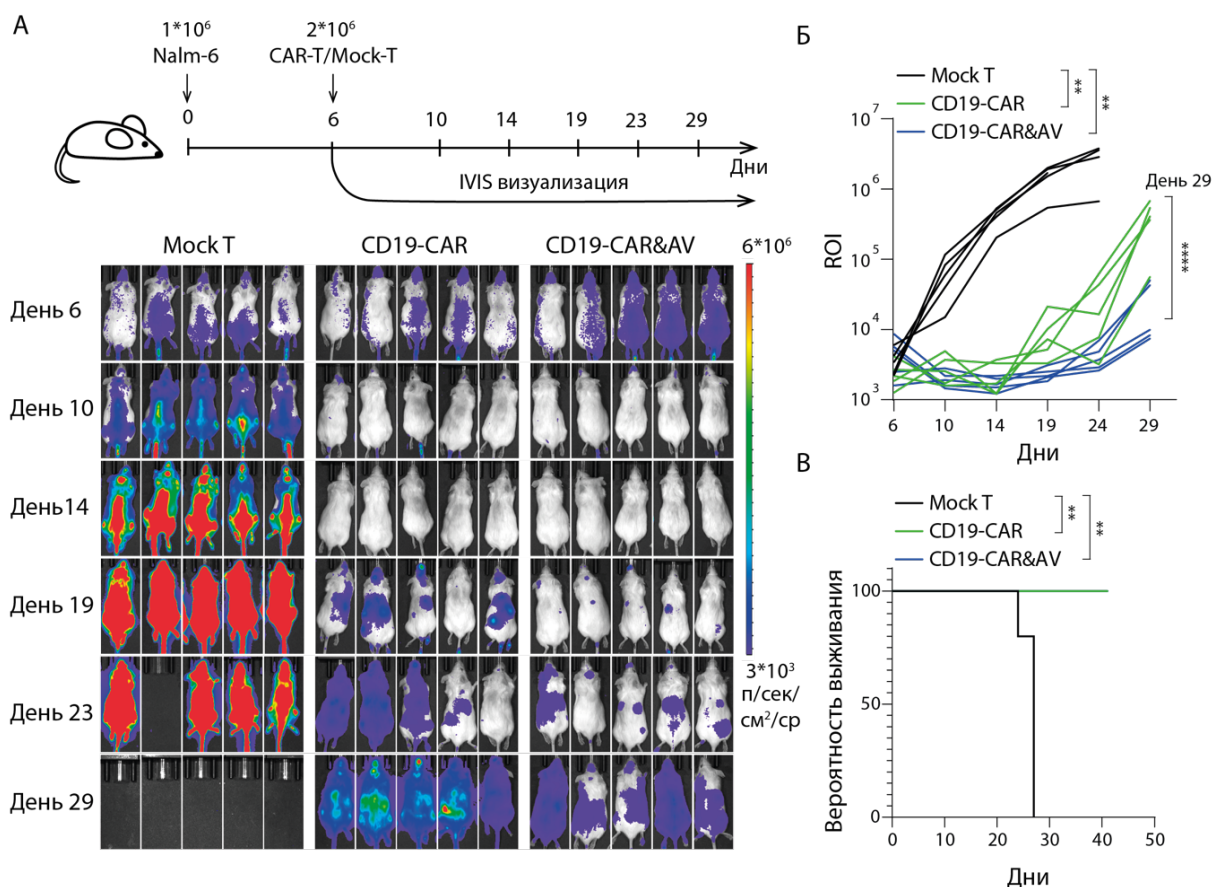


Рисунок 33 Анализ эффективности *in vivo* CAR T клеток, предварительно стимулированных CD19-AV или ИЛ-2. (А) Мышам с развившейся опухолью на 6 день вводили равное количество контрольных T клеток (Mock-T) человека или CAR19 T клеток, которые размножили в присутствии либо ИЛ-2, либо CD19-AV. (Б) Опухолевая нагрузка по данным биолуминесцентной визуализации, измеренная с течением времени; Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента. (В) Кривая выживаемости Каплана – Мейера.

Внедрение антигенных искусственных везикул в процесс создания CAR T клеток представляет собой уникальную и простую в исполнении технологию. Метод получения и применения AV для размножения CAR T клеток в лабораторных условиях может существенно упростить, удешевить и ускорить процесс получения терапевтических CAR T клеток с повышенной эффективностью и улучшенными свойствами. AV, несмотря на свою опухолевую природу, оказывают положительное влияние на популяцию CAR-положительных клеток, активируя их и стимулируя пролиферацию.

III. ВЫВОДЫ

1. На основе принципов комбинаторной химии и биологии создан ряд технологий, позволяющих получить CAR, специфичные к В- и Т- клеточным рецепторам опухолевых клонов для адоптивной иммунотерапии лимфом и лейкозов. С применением комбинаторных библиотек антител были получены вируснейтрализующие антитела и антитела-агонисты рецептора тропомиозиновой тирозинкиназы В (TrkB).
2. Разработаны регулируемые CAR Т клетки, активность которых контролируется с помощью белковых или низкомолекулярных адаптерных молекул. Разделение этапов распознавания и уничтожения опухолевых клеток с помощью адаптерных молекул позволяет задавать чувствительность CAR Т лимфоцитов к количеству опухоль-ассоциированного антигена *in vitro*, а также контролировать персистенцию и активность модифицированных Т клеток *in vivo*.
3. Впервые было показано, что ДНК-кодированные библиотеки химических соединений позволяют де-ново обнаружить низкомолекулярные лиганды опухолевых антигенов и направлять цитотоксичность CAR Т клеток.
4. Впервые было показано, что применение искусственных везикул, несущих антигены CAR, оказывает положительное влияние на популяцию CAR Т клеток, активируя их и стимулируя пролиферацию *in vitro* и *in vivo*.
5. Впервые показана эффективность устойчивых к аутоксичности CD45^Δ CAR45 Т клетки клеток с нокаутом гена *PTPRC* для элиминации опухолевых клеток и мононуклеарных клеток периферической крови *in vitro* и *in vivo*.
6. Впервые показана противоопухолевая активность аллогенных CAR19 Тm клеток в пациентах с рецидивом ОЛЛ. Продемонстрирована эффективность децентрализованной модели производства CAR Т клеток с помощью автоматизированных систем.
7. Показано, что внеклеточная ДНК, ловушки нейтрофилов и опухолевые экзосомы играют важную роль в иммуносупрессии в микроокружении опухоли, снижая активность Т клеток и затрудняя эффективность CAR Т клеточной терапии. Введение аденоассоциированных вирусов, кодирующих ДНКазу I, позволяет восстанавливать иммунный ответ и повышать эффективность терапии. Кроме того, использование CAR с внутриклеточным блокатором PD-1 помогает преодолеть иммуносупрессию при высокой экспрессии PD-L1 у опухолевых клеток, хотя и вызывает быстрое истощение Т-лимфоцитов.

IV. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. **Stepanov AV**, Markov OV, Chernikov IV, Gladkikh DV, Zhang H, Jones T, et al. Autocrine-based selection of ligands for personalized CAR-T therapy of lymphoma. **Science Advances**. 2018 Nov;4(11):eaau4580.
2. Jinqi Huang*, **Stepanov Alexey***, Jian Li, Terri Jones, Geramie Grande, Lacey Douthit, Jun Xie, Danna Chen, Xiaolei Wu, Maschan Michael, Changchun Xiao, Jiangning Zhao, Xuehua Xie, Jia Xie, Xiaolei Chen, Guo Fu, Gabibov Alexander & Chi-Meng Tzeng. Unique CDR3 epitope targeting by CAR-T cells is a viable approach for treating T-cell malignancies. **Leukemia**. 2019 Sep 1;33(9):2315–9.
3. **Stepanov AV**, Xie J, Zhu Q, Shen Z, Su W, Kuai L, et al. Control of the antitumour activity and specificity of CAR T cells via organic adapters covalently tethering the CAR to tumour cells. **Nature Biomedical Engineering**. 2024 May;8(5):529–43.
4. **Stepanov AV**, Kalinin RS, Shipunova VO, Zhang D, Xie J, Rubtsov YP, et al. Switchable targeting of solid tumors by BsCAR T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2022;119(46):e2210562119.
5. Ukrainskaya V, Rubtsov Y, Pershin D, Podoplelova N, Terekhov S, Yaroshevich I, Sokolova A, Bagrov D, Kulakovskaya E, Shipunova V, Deyev S, Ziganshin R, Chernov A, Telegin G, Maksimov E, Markov O, Oshchepkova A, Zenkova M, Xie J, Zhang H, Gabibov A, Maschan M, **Stepanov A***, Lerner R. Antigen-Specific Stimulation and Expansion of CAR-T Cells Using Membrane Vesicles as Target Cell Surrogates. **Small**. 2021;17(45):2102643.
6. Merkouris S, Barde YA, Binley KE, Allen ND, **Stepanov AV**, Wu NC, et al. Fully human agonist antibodies to TrkB using autocrine cell-based selection from a combinatorial antibody library. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2018;115(30):E7023–32.
7. Lu W, Lyu H, Xiao X, Bai X, Zhang M, Wang J, Pu Y, Meng J, Zhang X, Zhu H, Yuan T, Wang B, Jin X, Cao X, Wang Z, Xie T, Meng H, **Stepanov AV**, Gabibov AG, An Y, Sun R, Zhang Y, Maschan MA, Zhu Z, Zhang H, Zhao M. Prophylactic donor-derived CD19 CAR-T cell infusion for preventing relapse in high-risk B-ALL after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Leukemia**. 2024 Jun;38(6):1419–22.
8. Ukrainskaya V, Molostova O, Shelikhova L, Pershin D, Kulakovskaya E, Volkov D, Rakhtenko A, Muzalevskii Y, Kazachenok A, Brilliantova V, Osipova D, Rubtsov Y, **Stepanov A***, Maschan M. Haploidentical donor-derived memory CAR T cells: first in human experience and in vitro correlative study. **Blood Advances**. 2022;6(19):5582–8.
9. Maschan M, Caimi PF, Reese-Koc J, Sanchez GP, Sharma AA, Molostova O, Shelikhova L, Pershin D, **Stepanov AV**, Muzalevskii Y, Suzart VG, Otegbeye F, Wald D, Xiong Y, Wu D, Knight A, Oparaocha I, Ferencz B, Roy A, Worden A, Kruger W, Kadan M, Schneider D, Orentas R, Sekaly RP, de Lima M, Dropulić B. Multiple site place-of-care manufactured anti-CD19 CAR-T cells induce high remission rates in B-cell malignancy patients. **Nature communications**. 2021;12(1):7200.
10. Guo Y, Huang L, Zhang G, Yao Y, Zhou H, Shen S, Shen B, Li B, Li X, Zhang Q, Chen M, Chen D, Wu J, Fu D, Zeng X, Feng M, Pi C, Wang Y, Zhou X, Lu M, Li Y, Fang Y, Lu YY, Hu X, Wang S, Zhang W, Gao G, Adrian F, Wang Q, Yu F, Peng Y, Gabibov AG, Min J, Wang Y, Huang H, **Stepanov AV**, Zhang W, Cai Y, Liu J, Yuan Z, Zhang C, Lou Z, Deng F, Zhang H, Shan C, Schweizer L, Sun K, Rao Z. A SARS-CoV-2 neutralizing antibody with

- extensive Spike binding coverage and modified for optimal therapeutic outcomes. **Nature Communications**. 2021 May 11;12(1):2623.
11. Zhou X, Wang H, Ji Q, Du M, Liang Y, Li H, Li F, Shang H, Zhu X, Wang W, Jiang L, **Stepanov AV**, Ma T, Gong N, Jia X, Gabibov AG, Lou Z, Lu Y, Guo Y, Zhang H, Yang X. Molecular deconvolution of the neutralizing antibodies induced by an inactivated SARS-CoV-2 virus vaccine. **Protein & Cell**. 2021 Oct 1;12(10):818–23.
 12. Xia Y, He J, Zhang H, Wang H, Tetz G, Maguire CA, Wang Y, Onuma A, Genkin D, Tetz V, **Stepanov AV**, Terekhov S, Ukrainskaya V, Huang H, Tsung A. AAV-mediated gene transfer of DNase I in the liver of mice with colorectal cancer reduces liver metastasis and restores local innate and adaptive immune response. **Molecular Oncology**. 2020;14(11):2920–35.
 13. Ye K, Li F, Wang R, Cen T, Liu S, Zhao Z, Li R, Xu L, Zhang G, Xu Z, Deng L, Li L, Wang W, **Stepanov AV**, Wan Y, Guo Y, Li Y, Wang Y, Tian Y, Gabibov AG, Yan Y, Zhang H. An armed oncolytic virus enhances the efficacy of tumor-infiltrating lymphocyte therapy by converting tumors to artificial antigen-presenting cells in situ. **Molecular Therapy**. 2022;30(12):3658–76.
 14. Ukrainskaya VM, Musatova OE, Volkov DV, Osipova DS, Pershin DS, Moysenovich AM, Evtushenko EG, Kulakovskaya EA, Maksimov EG, Zhang H, Rubtsov YP, Maschan MA, **Stepanov AV***, Gabibov AG. CAR-tropic extracellular vesicles carry tumor-associated antigens and modulate CAR T cell functionality. **Scientific Reports**. 2023 Jan 10;13(1):463.
 15. Kalinin RS, Ukrainskaya VM, Chumakov SP, Moysenovich AM, Tereshchuk VM, Volkov DV, Pershin DS, Maksimov EG, Zhang H, Maschan MA, Rubtsov YP, **Stepanov AV***. Engineered removal of PD-1 from the surface of CD19 CAR-T cells results in increased activation and diminished survival. **Frontiers in molecular biosciences**. 2021;8:745286.
 16. Smirnov I, Belogurov Jr A, Golovin A, **Stepanov A**, Zhang H, Blackburn GM, et al. Immunoglobulin Go: Synergy of Combinatorics for Catalysis. **Israel Journal of Chemistry**. 2023;63(10–11):e202300078.
 17. Kalinin R, Petukhov A, Knorre V, Maschan M, **Stepanov A**, Gabibov A. Molecular approaches to safe and controlled engineered T-cell therapy. **Acta Naturae** (англоязычная версия). 2018;10(2 (37)):16–23.
 18. Volkov DV, Tetz GV, Rubtsov YP, **Stepanov AV**, Gabibov AG. Neutrophil extracellular traps (NETs): Opportunities for targeted therapy. **Acta naturae**. 2021;13(3):15.
 19. Volkov DV, Stepanova VM, Rubtsov YP, **Stepanov AV**, Gabibov AG. Protein Tyrosine Phosphatase CD45 As an Immunity Regulator and a Potential Effector of CAR-T therapy. **Acta Naturae**. 2023 Oct 30;15(3):17–26.
 20. Stepanova V, Volkov D, Osipova D, Wang W, Hou Y, Pershin D, Fadeeva M, Malakhova E, Kulakovskaya E, Cuicui L, Mingfeng Z, Zhang H, Xie J, Zhang D, Mamedov I, Chernov A, Telegin G, Rubtsov Y, Gabibov A, Wu P, Maschan M, **Stepanov AV***. Targeting CD45 by gene-edited CAR T cells for leukemia eradication and hematopoietic stem cell transplantation preconditioning. **Molecular Therapy Oncology** 2024 Sep 19;32(3).
 21. Popov P, Kalinin R, Buslaev P, Kozlovskii I, Zaretskii M, Karlov D, Gabibov A, **Stepanov A**. Unraveling viral drug targets: a deep learning-based approach for the identification of potential binding sites. **Briefings in Bioinformatics**. 2024;25(1):bbad459.
 22. Ukrainskaya VM, Rubtsov YP, Knorre VD, Maschan MA, Gabibov AG, **Stepanov AV***. The Role of Tumor-Derived Vesicles in the Regulation of Antitumor Immunity. **Acta Naturae**. 2019 Dec 15;11(4):33–41.

Патенты

1. **Степанов Алексей Вячеславович**, Украинская Валерия Михайловна, Белогуров Алексей Анатольевич, Габибов Александр Габибович. “Способ получения модельной иммортализованной линии клеток, содержащей поверхностно-экспонированный аналог в-клеточного рецептора неходжкинских лимфом человека.” Патент РФ № RU2720912C1, 2018 г.
2. **Alexey Vyacheslavovich Stepanov**, Dmitry Dmitrievich Genkin, Alexander Gabibovich Gabibov, Richard A. Lerner, Alexey Anatolievich Belogurov, Jia Xie. “Articles and methods directed to personalized therapy of cancer.” Международный патент №WO2019070161, 2018 г.
3. Genkin Dmitry Dmitrievich, **Stepanov Alexey Vyacheslavovich**, Dubina Michael Vladimirovich, Bogdanov Alexey Alexandrovich, Gabibov Alexander Gabibovich. “Reprogramming of polymorphonuclear leukocytes.” Международный патент №WO2020212756A2, 2020 г.
4. Maksim Mamonkin, Norihiro Watanabe, **Alexey Stepanov**, Ding Zhang. “Terminal deoxynucleotidyl transferase antibodies and uses thereof.” Международный патент №WO2023212676A1, 2023 г.
5. Sergey Deev, Alexander Gabibov, **Alexey Stepanov**, Richard A. Lerner. “Switchable CAR-T Compositions Containing Barnase-Barstar Motifs.” Международный патент №WO2024232911A1, 2023 г.
6. Richard A. Lerner, Jia Xie, **Alexey Stepanov**. “CAR T therapies targeted via covalently bonded adapters.” Международный патент №WO2023154708, 2023 г.
7. Dmitry Dmitrievich Genkin, Georgy Viktorovich Tets, Viktor Veniaminovich Tets, **Alexey Vyacheslavovich Stepanov**. “Combination of deoxyribonuclease enzyme and cell therapies for treatment of cancer.” Международный патент №WO2022150609A1, 2022 г.

Работа была выполнена при поддержке Министерства образования и науки (*Грант № 075-15-2024-536*).