

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

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва, 2025

Оглавление

Список сокращений	5
1 Введение.....	7
2 Обзор литературы	19
2.1 Структура химерных антигенных рецепторов	19
2.2 Способы производства CAR T клеток	22
2.3 Пролиферация и экспансия и CAR T клеток <i>in vivo</i>	25
2.3.1 CD45RA-негативные аллогенные CAR T клетки	28
2.4 Выбор антигенов для CAR T клеточной терапии	32
2.4.1 Химерные рецепторы, содержащие лиганды опухолевых и аутореактивных клеток	35
2.4.2 Лимфодеплеция гемопоэтических клеток с помощью CAR T клеток.....	36
2.5 Подходы к увеличению безопасности CAR T клеточной терапии	38
2.5.1 Контроль активации химерного антигенного рецептора	39
2.5.2 Элиминация CAR T клеток с помощью низкомолекулярных соединений и моноклональных антител	40
2.5.3 Экспрессия нескольких химерных антигенных рецепторов и комбинирование передаваемых сигналов.....	41
2.5.4 Применение мРНК для модификации Т клеток. Применение <i>in vivo</i> CAR.....	42
2.6 Модульные химерные антигенные рецепторы.....	43
2.6.1 Биотин-связывающий иммунный рецептор	44
2.6.2 Анти-FITC CAR	45
2.6.3 SPY CAR.....	45
2.6.4 Лейциновая молния SUPRA CAR	46
2.6.5 INKG2D CAR	46
2.6.6 SNAP CAR.....	46
2.6.7 CO-LOCKR CAR	47
2.6.8 Анти-5B9 CAR	47
2.6.9 Анти-GCN4 CAR.....	48
2.7 Роль микроокружения опухоли при терапии CAR T клетками	48
3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	52
3.1 Химические реактивы и сопутствующие материалы.	52
3.2 Работа с нуклеиновыми кислотами.....	54
3.2.1 Амплификация ДНК методом ПЦР	54
3.2.2 Рестрикция плазмидной ДНК и ПЦР продуктов	55
3.2.3 Молекулярное клонирование	55
3.2.4 Трансформация клеток E.coli методом теплового шока.....	55
3.2.5 Выделение плазмидной ДНК	56
3.2.6 Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	56
3.2.7 Получение последовательностей кДНК генов белков из эукариотических клеток.....	57
3.2.8 Создание генетических конструкций	57
3.3 Работа с белками	58
3.3.1 Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле	58
3.3.2 Вестерн-блот анализ	58
3.3.3 Продукция дарпин-барназы	59
3.3.4 Конъюгация белков с FITC	59
3.3.5 Поверхностный плазмонный резонанс	59
3.4 Работа с культурами эукариотических клеток	60
3.4.1 Поддержание в культуре адгезионных эукариотических клеток	60
3.4.2 Поддержание в культуре суспензионных эукариотических клеток	60

3.4.3	Трансфекция для получения лентивирусных частиц	60
3.4.4	Создание аденоассоциированных вирусных частиц	61
3.4.5	Выделение Т клеток	61
3.4.6	Получение CAR Т клеток	61
3.4.7	Трансдукция клеточных линий.....	62
3.4.8	Нокаут генов клеток	62
3.4.9	Экспрессия рекомбинатных белков	63
3.5	Получение и характеристика экзосом и везикул	63
3.5.1	Выделение экзосом	63
3.5.2	Получение искусственных антигенные везикул	63
3.5.3	Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ).....	64
3.5.4	Детекция хемилюминесценции CD63-nanoluc экзосом	64
3.5.5	Конфокальная микроскопия искусственных везикул и CAR Т клеток	64
3.5.6	Сканирующая электронная микроскопия искусственных везикул и CAR Т клеток	64
3.5.7	Анализ искусственных везикул методом жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии	65
3.6	Функциональные эксперименты	66
3.6.1	Проточная цитофлуориметрия	66
3.6.2	Инкубация CAR Т клеток в присутствии экзосом (EV)	67
3.6.3	Анализ эффекторной активности CAR Т-клеток	67
3.6.4	Детекция секреции провоспалительных цитокинов методом ELISA	69
3.6.5	Получение репортерных клеток Jurkat-NFAT-luc и анализ активации клеток.....	70
3.6.6	Анализ уровня дегрануляции Т-клеток.....	70
3.6.7	Выделение мРНК и Nanostring анализ	70
3.6.8	Изучение пролиферативной активности CAR Т клеток	71
3.6.9	Анализ истощения и дифференциации CAR Т-клеток под действием AV.....	71
3.6.10	Внутриклеточная детекция провоспалительных цитокинов CD45 ^A Т клеток	72
3.6.11	Анализ активности ДНКазы I	73
3.7	Работа с животными	73
3.7.1	Получение опухолевых клеток, экспрессирующих ген люциферазы.....	73
3.7.2	Анализ эффективности CAR19 Т клеток после культивации с AV in vivo	73
3.7.3	Анализ эффективности CD45Δ CAR Т клеток in vivo	74
3.7.4	Анализ эффективности регулируемых Bs-CAR Т клеток in vivo	74
3.7.5	Анализ эффективности регулируемых CovCAR Т клеток in vivo	75
3.7.6	Анализ фармакологического контроля активации и пролиферации CovCAR Т-клеток после введения адаптера-дикетона	76
3.7.7	Анализ эффективности опухоль-специфичных CAR Т клеток in vivo	76
3.7.8	Работа с мышами линии C57BL/6	77
3.7.9	Иммуногистохимия	78
3.7.10	Идентификация и реконструкция В-клеточного рецептора клеток лимфомы.....	78
3.7.11	Селекция низкомолекулярных соединений из библиотеки DEL.....	81
3.7.12	Синтез органических соединений	81
3.7.13	Отбор антител агонистов TrkB	81
3.7.14	Эксперименты с эксплантами сетчатки мыши	82
3.7.15	Статистический анализ.....	83
4	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	84
4.1	Создание опухоль-специфичных CAR Т клеток для терапии лимфом и лейкоз	84
4.1.1	Аутокринный отбор лигандов опухолевых клонов для CAR Т клеточной терапии В-клеточных лимфом	85
4.1.2	Отбор антител, специфичных к Т клеточному рецептору, для персонализированной CAR терапии Т-клеточных лимфом.....	95
4.1.3	Аутокринный отбор антител-агонистов рецептора нейротрофического фактора головного мозга для терапии диабетический ретинопатии	101
4.2	Создание контролируемых химерных антигенных рецепторов.....	106

4.2.1	Контроль противоопухолевой активности и специфичности CAR T клеток с помощью органических адаптеров и CAR с каталитической активностью	107
4.2.2	Поиск новых органических лигандов опухолевых антигенов с помощью ДНК-кодированных библиотек химических соединений (DEL) для создания адаптеров CovCAR T клеток.	115
4.2.3	Контроль противоопухолевой активности и специфичности CAR T клеток с помощью молекулярной пары барназа – барстар	121
4.3	Таргетирование пан-лейкоцитарного антигена CD45 и оптимизация эффекторной популяции для CAR T клеточной терапии гемопоэтических опухолей..	130
4.3.1	Создание CD45 ^Δ CAR45 T клеток, устойчивых к фратрициду, для адоптивной иммунотерапии терапии гемопоэтических опухолей	131
4.3.2	Исследование терапевтического потенциала аллогенных CAR19 T клеток, произведенных из CD45RA-негативных T клеток памяти.	142
4.3.3	Использование автоматизированных закрытых систем для децентрализованного производства CAR T клеточного продукта.	149
4.4	Изучение влияния факторов микроокружения опухоли на противоопухолевую активность CAR T клеток	153
4.4.1	Блокирование выхода PD-1 на поверхность CAR T клеток усиливает их активацию и снижает выживаемость	153
4.4.2	Изучение влияния экзосом EV на противоопухолевую активность CAR T-клеток	158
4.4.3	Влияние искусственных антигенных везикул (AV) на противоопухолевую активность CAR T-клеток	164
4.4.4	ДНКазы I уменьшают негативные эффекты опухолевого микроокружения	177
5	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	182
6	ВЫВОДЫ.....	192
7	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	193

Список сокращений

Русские:

АПК – антигенпрезентирующие клетки

В-НХЛ – В-клеточная неходжкинская лимфома

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ИЛ – интерлейкин

ИНФ- γ – гамма-интерферон

НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева – Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева

МкАТ – моноклональные антитела

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз

РТПХ – реакция трансплантат против хозяина

ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

ТКР – Т клеточный рецептор

Т-ОЛЛ – Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз (T-ALL)

ХЛЛ – хронический лимфоцитарный лейкоз

Английские:

B-ALL – В клеточный острый лимфобластный лейкоз (B-cell acute lymphoblastic leukemia)

BCMA – В клеточный антиген созревания (B cell maturation antigen)

BiTE – би-специфический активатор Т клеток (bispecific T cell engager)

CAR – химерные антигенные рецепторы (chimeric antigen receptors)

CAR NK – NK клетки, модифицированные химерным антигенным рецептором (chimeric antigen receptors modified NK cells)

CAR Т клетки – Т клетки, модифицированные химерным антигенным рецептором (chimeric antigen receptors modified T cells)

CAR Tm – CAR Т клетки, полученные из CD45RA-негативных Т клеток памяти (CD45RA⁻ CAR T)

CAR19 Tm – CAR19 Т клетки, полученные из CD45RA-негативных Т клеток памяти (CD45RA⁻ CAR19 T)

CD – кластер дифференцировки (cluster of differentiation)

CD45^Δ – клетки, нокаутные по гену CD45

CFD – значение, отражающее вероятность неспецифической активности Cas9 для конкретного сайта (cutting frequency determination)

CRS – синдром выброса цитокинов (cytokine release syndrome)

DEL – ДНК-кодированные библиотеки химических соединений (DNA encoded library)

ffLuc – люцифераза светлячка (firefly luciferase)

GFP – зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein)

gRNA – гидовая РНК (guide RNA)

HLA – человеческие лейкоцитарные антигены (human leukocyte antigen)

ITAM – иммунорецепторные тирозиновые мотивы активации (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)

MRD – минимальное остаточное заболевание (minimal residual disease)

NSG – линия иммунодефицитных мышей *NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{em1Smoc}*

NCG – линия иммунодефицитных мышей (NOD.CBA-Rag1<null>/Nju)

NK – натуральные киллеры (natural killer)

T_{CM} – Т клетки центральной памяти (central memory T cells)

T_E – эффекторные, терминально дифференцированные Т клетки (effector T cells)

T_{EM} – Т клетки эффекторной памяти (effector memory T cells)

T_N – наивные Т клетки

PBMC – мононуклеарные клетки периферической крови (peripheral blood mononuclear cells)

PTP – белковая тирозиновая фосфатаза (protein tyrosine phosphatase)

SFK – тирозиновые киназы семейства Src (Src family kinase)

Y394 – активирующий тирозин киназы Lck

Y505 – ингибирующий тирозин киназы Lck

1 Введение

Актуальность исследования

Развитие иммунологии, 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. Идею объединения преимуществ специфичности антител с цитотоксичностью Т лимфоцитов в 1989 г. предложил профессор Зелиг Эшхар в своей работе “Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity”. Дальнейшее развитие данной идеи привело к появлению нового класса терапии с помощью Т клеток, модифицированных химерным антигенным рецептором (chimeric antigen receptor; CAR Т клеток). На сегодняшний день существует семь препаратов CAR Т клеток, одобренных к применению управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA). Данные CAR Т клетки направлены к двум антигенам на поверхности В клеток, CD19 и В клеточный антиген созревания (BCMA). На сегодняшний день основная часть CAR Т клеток специфичных к CD19 и BCMA производится в специализированных производствах, принадлежащих крупным фармацевтическим компаниям. Цикл производства CAR Т клеток включает выделение клеток пациента, их заморозка и транспортировка в центр производства, производство и заморозка CAR Т клеток, и отправка обратно для введения пациенту. Помимо сложностей логистического характера, такой CAR Т клеточный продукт имеет крайне высокую стоимость. Быстрое развитие CAR Т клеточных технологий невозможно без развития децентрализованного производства CAR Т клеток, которое позволяет получить клеточный продукт с учетом индивидуальных особенностей течения заболевания каждого пациента или под задачи исследования терапевтического потенциала нового CAR.

Впечатляющие результаты клинического применения CAR Т клеток, специфичных к CD19, выдвинули CAR Т 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 Т 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 расширения области применения CAR T клеток стал выбор антигена опухоли. Основными критериями при выборе опухолевого антигена является отсутствие 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 клетками). На сегодняшний день при выборе антиген-распознающих доменов CAR чаще всего используют переменные домены известных антител. Данные антитела являются мышиными иммуноглобулинами (FMC63, основной клон при создании CAR специфичного к CD19) или их гуманизированными производными. 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 опухоль-специфичных 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. Важно отметить, что для ряда пациентов невозможно применять предтрансплантационную химио- или радиотерапию в силу наследственных заболеваний, связанных с нарушениями механизмов репарации геномной ДНК (анемия Фанкони, синдром Ниймеген и др.).

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 эффективны для терапии солидных опухолей. К основным причинам низкой эффективности 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 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 Т клетки, специфичные к CD45, для повышения эффективности и снижения риска рецидива после трансплантации гемопоэтических клеток.

Научная новизна 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 Т клеток, а также фагового дисплея иммуноглобулинов человека.

Для увеличения безопасности адоптивной иммунотерапии созданы 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, а также контролировать персистенцию и активность модифицированных Т клеток *in vivo*. Для расширения областей применения регулируемых CAR Т 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.

Теоретическая и практическая значимость

Практическая значимость представленной работы состоит в усовершенствовании современных подходов адоптивной иммунотерапии CAR T клетками.

В работе был реализован новый подход к терапии опухолевых заболеваний, основанный на создании опухоль-специфичных CAR для терапии лимфом и лейкоз с помощью скрининга лентивирусных библиотек химерных рецепторов и репортерных Т клеток, а также фагового дисплея иммуноглобулинов человека.

Были 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, а также контролировать персистенцию и активность модифицированных Т клеток *in vivo*.

В диссертационной работе описано первое в мире клиническое применение CAR19 Тм клеток сформированное из популяции клеток памяти для пациентов, страдающих В-клеточным острым лимфобластным лейкозом, которые ранее прошли курс как традиционных, так и иммунотерапевтических методов лечения, среди которых были терапия аутологичными CAR19 Т клетками, блинатумомабом и ТГСК. Были разработаны CAR Т клетки специфичные к CD45, которые позволяют 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. В данной диссертационной работе, для подавления взаимодействия PD-1 с PD-L1, был разработан внутриклеточный блокатор выхода PD-1 на поверхность CAR Т клетки. Дополнительно, было изучено влияние опухолевого микроокружения опухоли на эффективность адоптивной иммунотерапии, в частности иммуносупрессорная роль опухолевых внеклеточных экзосом и внеклеточной ДНК. Изучение особенностей взаимодействия экзосом с CAR Т клетками позволило создать искусственные везикулы, добавление которых в культуру CAR Т клеток оказывает

положительное влияние на популяцию CAR-положительных клеток, активируя их и стимулируя пролиферацию. 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.

Методология и методы исследования

Результаты, представленные в настоящей диссертационной работе, получены с использованием различных современных методов. При создании новых генетических конструкций были применены генно-инженерные методы.

Все манипуляции с животными были выполнены в соответствии с протоколами, одобренными этической комиссией ИБХ РАН, межинститутской комиссией по биоэтике Сибирского отделения Российской академии наук (СО РАН) для экспериментов в Центре генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН или одобрены комитетом по уходу за животными и использованию животных при Институте исследований Скриппса (The Scripps Research Institute, США). Для проведения *in vivo* экспериментов были использованы наиболее актуальные сингенные и ксеногенные животные модели опухолевых заболеваний. Для анализа динамики роста опухоли были использованы системы прижизненной визуализации IVIS Perkin Elmer.

При работе с белковыми молекулами были использованы методы аффинной хроматографии, поверхностного плазмонного резонанса, масс-спектрометрии, гель-фильтрации, абсорбционной спектроскопии и флуоресцентной спектроскопии. Работы, посвященные контролю противоопухолевой активности и специфичности CAR Т клеток с помощью молекулярной пары барназа – барстар выполнены совместно с академиком Деевым С.М. и сотрудниками его лаборатории в ГНЦ ИБХ РАН. При работе с клеточными культурами были использованы методы конфокальной микроскопии, проточной цитофлуориметрии, сортировки клеток с активацией флуоресценции, электрофореза, иммуноферментного анализа и вестерн-блот. Анализ формы и размера выделенных экзосом и искусственных везикул был проведен на кафедре биоинженерии МГУ им. Ломоносова совместно с Багровым Д.В. Для характеристики размера экзосом был использован метод NTA анализа.

Для поиска новых лигандов опухолевых клеток были и использованы фаговый дисплей, скрининг лентивирусных библиотек химерных рецепторов в системе репортерных Т клеток, а также скрининг ДНК-кодированных библиотек химических соединений DEL. Для получения низкомолекулярных адаптерных молекул CAR Т клеток, отобранных в

результате скрининга DEL библиотек, в лабораториях Фила Барана и Ричарда Лернера (Scripps Research, США), а также компании WuXi AppTec (Шанхай, Китай) был проведен синтез данных соединений, конъюгированных с дикетоном.

Для всех результатов, представленных в работе, показана воспроизводимость в независимых экспериментах, проведен необходимый анализ с применением методов статистики. Представленные методы позволили реализовать поставленные задачи и подойти к их решениям комплексно с разных сторон: от исследований в системах *in vitro* на клеточных культурах, животных моделях *in vivo* и *ex vivo* на материалах пациентов.

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.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность и обоснованность полученных результатов и выводов не вызывают сомнений. Степень достоверности результатов обеспечивается тем, что все экспериментальные работы выполнены на современном сертифицированном оборудовании и с использованием самых современных методов генетической инженерии, молекулярной биологии, энзимологии и животных моделей. Большая часть работы по созданию опухоль-специфичных CAR-Т клеток для терапии лимфом и лейкозов, а также регулируемых CAR Т клеток на основе каталитического антитела 38C2 проводилась лично автором в лаборатории биокатализа ГНЦ ИБХ РАН, а также Scripps Research (Ла Хойя, Калифорния) под руководством Ричарда Лернера, основателя института (который, согласно индексу Nature, занимает первое место среди самых влиятельных научно-исследовательских учреждений мира в области инноваций) и Роджера Корнберга – лауреата Нобелевской премии по химии 2006 г.

Для всех результатов, представленных в работе, показана воспроизводимость в независимых экспериментах, проведен необходимый анализ с применением методов статистики. Для проведения *in vivo* экспериментов были использованы наиболее актуальные сингенные и ксеногенные животные модели опухолевых заболеваний. Для анализа динамики роста опухоли были использованы системы прижизненной визуализации IVIS Perkin Elmer. Определение силы белок-белковых взаимодействий было

проведено с применением самого совершенного на сегодняшний момент прибора на основе эффекта поверхностного плазмонного резонанса – Т-200 на базе Центра нанотехнологий РАН Санкт-Петербургского академического университета и Scripps Research. Работы фагового дисплея, применения репортерных клеток и селекции химических соединений из DEL-библиотек выполнены под руководством Ричарда Лернера – основателя технологий. Для отбора новых низкомолекулярных лигандов опухолевых клеток из DEL библиотек были использованы мощности компании WuXi apptech – одной из крупнейших компаний в области разработки новых препаратов. Все работы выполнены на современном оборудовании с использованием реактивов от ведущих мировых производителей.

Список публикаций автора по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 22 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых базами данных Web of Science и Scopus.

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.

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 моноклеарными 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).

2 Обзор литературы

2.1 Структура химерных антигенных рецепторов

Развитие иммунологии, молекулярной биологии, биотехнологии и клеточных технологий позволили перейти от адоптивного переноса аутологичных иммунных клеток (TILs [1] или цитокин-индуцированных лимфоцитов [2]) к генетической модификации лимфоцитов с целью создания Т клеток, несущих химерные антигенные рецепторы или секретирующих цитокины для эффективного подавления роста опухоли [3, 4]. Для создания CAR Т клеток производят лейкофerez клеток пациента или донора, выделение популяции Т клеток и их активацию с помощью антител к CD3 и CD28, введение генов CAR в Т клетки (чаще всего с помощью ретро- или ленти- вирусных векторов), экспансию CAR Т клеток в присутствии цитокинов и введение пациенту (Рис. 2.1).

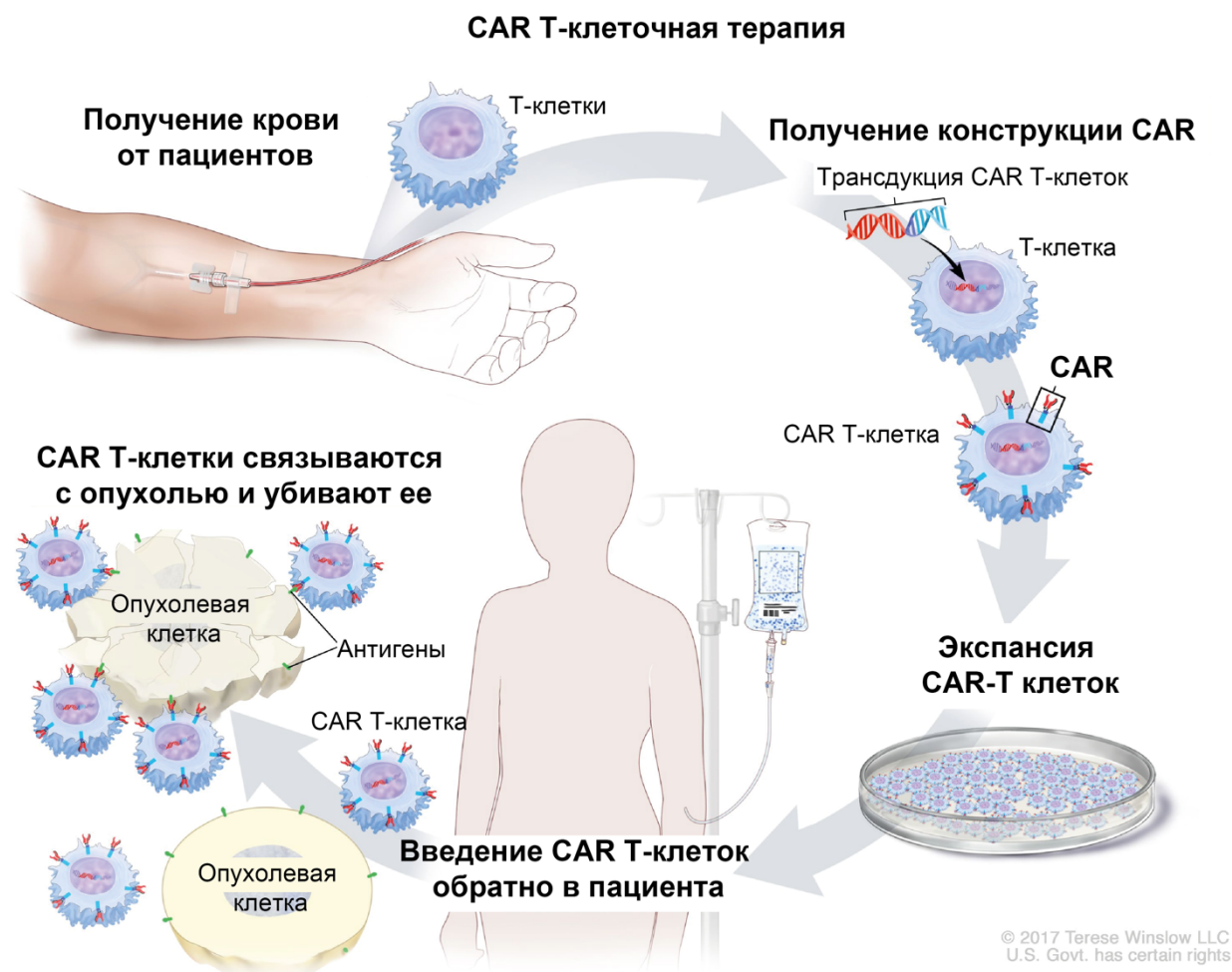


Рисунок 2.1. Схема процесса создания CAR Т клеточного продукта (адаптированная версия рисунка с сайта National Cancer Institute cancer.gov)

Химерные антигенные рецепторы (chimeric antigen receptor; CAR) - это искусственные молекулы, которые созданы для распознавания антигена на поверхности

раковых или патологически измененных клеток. На сегодняшний день существует множество различных подходов к дизайну рецепторов и получению Т клеток, модифицированных химерным антигенным рецептором (CAR Т клеток) [5]. Структурно CAR состоит из нескольких частей, включающих внеклеточный домен, распознающий антиген, трансмембранный и внутриклеточный домен, который запускает каскад активации лимфоцитов, приводящий к гибели клетки-мишени [6]. Химерные антигенные рецепторы объединяют в себе свойства нескольких звеньев адаптивного иммунитета, сочетая специфичность и аффинность антитела с цитотоксическими свойствами Т или НК клеток.

Внеклеточный домен CAR состоит из антиген-распознающей части, чаще всего это одноцепочечный вариабельный фрагмент (single chain fragment variable; scFv) антитела, а внутриклеточная часть содержит сигнальные домены Т-клеточного рецептора (ТкР) и костимуляторных молекул (**Рис. 2.2**). Развитие технологии химерных антигенных рецепторов привело к созданию CAR нескольких поколений. CAR первого поколения состояли из внеклеточного домена соединенного с цитоплазматической частью CD3 ζ , имитируя нормальную активацию через ТкР. Сигнала от CD3 ζ домена было достаточно для специфического лизиса опухолевых клеток [7, 8], но модифицированные Т клетки не персистировали в пациентах и оказались поэтому малоэффективными [9]. Для улучшения экспансии и персистенции Т клеток в последовательность CAR второго поколения к цитоплазматической части CD3 ζ были добавлены сигнальные домены костимуляторных рецепторов ТкР, такие как CD28 [10], 4-1BB [11] и другие [12]. Включение дополнительных сигналов значительно повысило эффекторные функции, экспансию и персистенцию CAR Т клеток [13]. Важно отметить, что CAR содержащие домены из CD28 или 4-1BB наиболее изучены в клинической практике, их использование позволяет получать CAR Т клетки с различными функциональными особенностями. CAR на основе CD28 способствует ускоренной пролиферации Т клеток, повышенному метаболизму глюкозы, клетки с этим ко-стимуляторным доменом относительно недолго персистируют в организме. В то же время, CAR на основе 4-1BB слабее индуцирует цитотоксические функции Т клеток, но одновременно стимулируют окисление липидов и поддерживает более продолжительную персистенцию Т клеток [13, 14]. Эти различия иллюстрируют возможность дифференциального репрограммирования Т клеток, используя разные варианты CAR второго поколения. Также, при разработке нового CAR стараются учитывать структурные особенности, присущие разным шарнирным и трансмембранным частям молекулы, которые сильно влияют на связывание антигена и передачу сигналов [10].

В третьем поколении CAR в состав молекулы рецептора включен еще один сигнал костимуляции, чаще всего из CD28 и 4-1BB, однако, в клинической практике,

преимущества третьего поколения над вторым поколением CAR пока неочевидны [15]. Кроме CD28 и 4-1BB, в качестве дополнительного костимуляторного домена также используют OX40 [16], ICOS [17], CD27 [18], и другие [12] (**Рис. 2.2**).

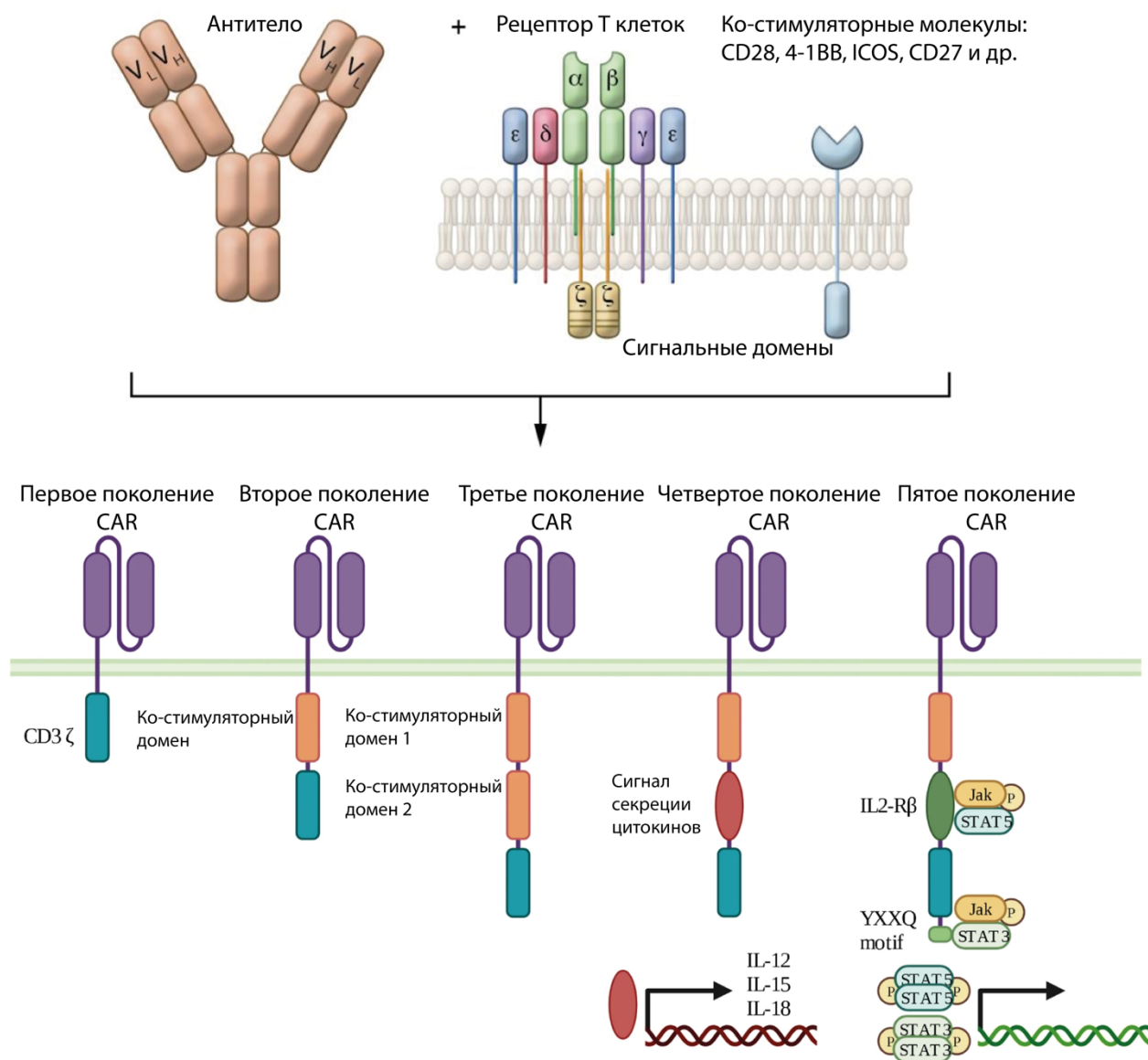


Рисунок 2.2. Структура и поколения химерных антигенных рецепторов. Адаптировано из [19, 20].

Дальнейшее усложнение передаваемых сигналов привело к появлению CAR четвертого и пятого поколений. Четвёртое поколение CAR также было разработано на основе структуры второго поколения. В вектор, кодирующий CAR, добавлены конструкции, позволяющие CAR T клетке секретировать цитокины или экспрессировать на поверхности белковые лиганды, участвующие во взаимодействии с другими клетками иммунной системы, как то дендритные клетки (ДК), макрофаги или регуляторные T клетки [21]. Созданы варианты CAR которые не только лизируют опухолевые клетки, но и

изменяют опухолевое микроокружение путем секреции цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18, либо экспрессией на поверхности CD40L или 4-1BBL [22-24]. Т клетки с такими конструкциями, называют TRUCKs (T-cell redirected for universal cytokine-mediated killing (TRUCKs)) [25, 26]. При создании CAR пятого поколения используют различные решения для усиления персистенции CAR, преодоления иммуносупрессии или повышения безопасности адоптивной иммунотерапии [27]. Например, включение в CAR укороченных доменов цитокиновых рецепторов (рецептор ИЛ-2), которые связываются с факторами транскрипции (STAT-3/5), улучшают персистенцию CAR Т клеток и предотвращают быстрое истощение CAR Т клеток после введения, по сравнению с CAR второго поколения [28].

Несмотря на многочисленные работы, посвященные оптимизации структуры химерных антигенных рецепторов, современные CAR технологии все еще являются грубым вмешательством в физиологию Т клеток. Например, для активации Т клетки в современных CAR используется сигнальный домены CD3 ζ . Однако, механизмы активации, распознавания антигена, аффинность TCR и CAR сильно отличаются [29-32]. Недавнее исследование показало, что сила сигнала от CAR является не оптимальной и избыточной. Достаточно оставить лишь один из трех мотивов ITAM CD3 ζ (Immunoreceptor Tyrosine Activation Motifs) в составе CAR чтобы значительно повысить эффективность и персистенцию CAR Т клеток [33]. С другой стороны, каждая из молекул CD3 ϵ , δ , γ , и ζ может совершенно по-разному влиять на свойства CAR Т клетки. Например, включение цитоплазматического домена CD3 ϵ в химерный антигенный рецептор второго поколения значительно улучшает противоопухолевую активность CAR Т клеток [34]. По всей видимости, необходимо дальнейшее совершенствование сигнальных доменов CAR, такие домены могут представлять собой гибридные молекулы сочетающие свойства разных CD3, которые будут оптимизированы для работы в составе CAR, а не Т клеточного рецептора.

2.2 Способы производства CAR Т клеток

На сегодняшний день в клинической практике существует два подхода производства CAR Т клеток: (1) стандартный централизованный процесс, при котором продукт производится в лабораториях принадлежащих фармацевтической компании; (2) децентрализованный метод, при котором CAR Т продукты производятся в одной или нескольких лабораториях клеточной терапии в рамках академических клинических испытаний и, иногда, коммерческого производства [6, 35-46].

Существует семь аутологичных продуктов CAR Т, одобренных FDA, которые производят фармацевтические компании Novartis, Kite/Gilead, BMS и Jansen [47] (**Рис. 2.3**).

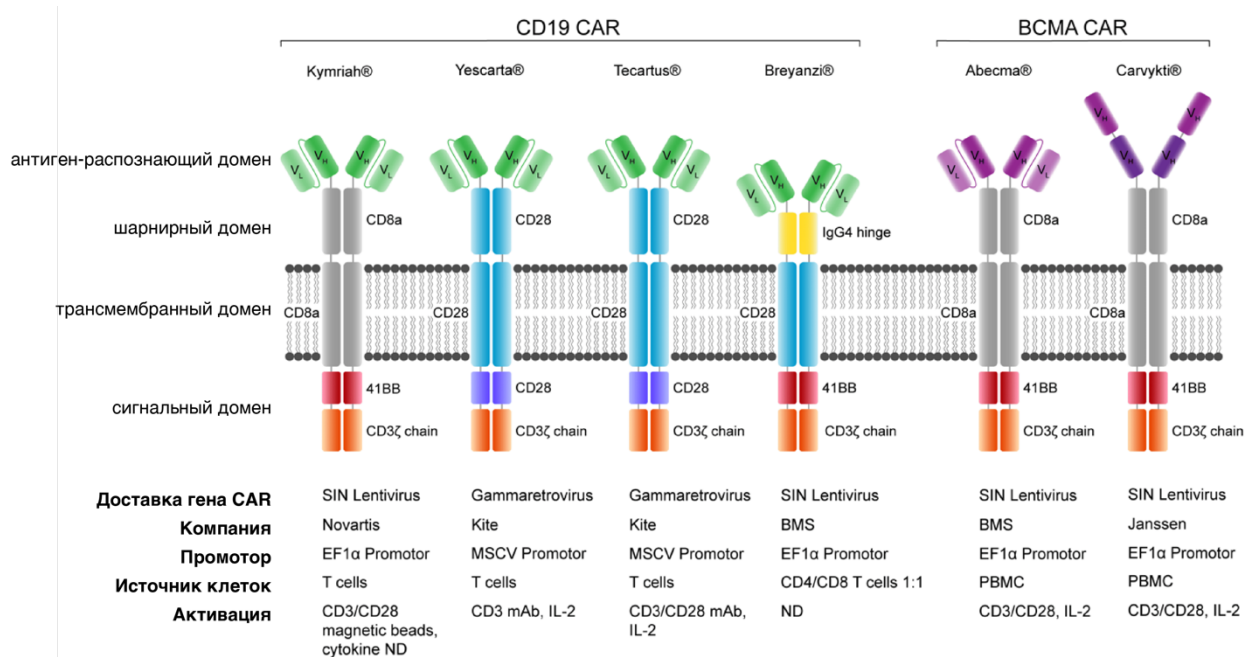


Рисунок 2.3. Структура и описание аутологичных продуктов CAR T клеток, одобренных для клинического применения. Адаптировано из [48].

Все эти продукты производятся по схеме стандартного централизованного процесса, при котором лечащий врач назначает конкретный продукт CAR T, PBMC пациента отправляются из лечащего медицинского учреждения в центральную лабораторию клеточной терапии (часто фармацевтические компании имеют предприятие в Северной Америке и еще одно в Европейском Союзе для поставок на два основных рынка CAR T). После изготовления и криоконсервации CAR T продукт отправляется обратно в клинику и вводится пациенту [6, 35, 38, 49]. Основным преимуществом централизованного производства является стандартизация качества, которая сводит к минимуму различия между продуктами. Однако из-за персонализированного характера производства аутологичных CAR T невозможно создать по-настоящему однородный клеточный продукт, более того, процессы контроля качества могут занимать больше времени, чем само производство [41, 50, 51].

В децентрализованной модели CAR T клеточный продукт обычно производится непосредственно в медучреждении, где находится пациент. В США и России модель децентрализованного производства была ограничена академическими центрами в контексте клинических испытаний. Такая система позволяет получить клеточный продукт более высокого качества и гораздо быстрее, что немаловажно для пациентов с быстро прогрессирующей патологией. Например, отказ от криоконсервации исходного материала может повлиять на количество и качество клеток, поскольку восстановление и

жизнеспособность РВМС часто снижаются после замораживания и оттаивания по сравнению со свежими продуктами афереза [42, 45, 51-54].

Ранее, во всех децентрализованных испытаниях использовали открытые системы производства. Производство CAR T клеток в открытых системах производилось в стерильных условиях и многие этапы выполнялись высококвалифицированными технологами вручную в процессе производства БМКП [55-59]. Быстрое развитие технологии биореакторов для производства БМКП и других технологий привело к росту количества центров с децентрализованной моделью производства CAR T клеток. Использование автоматизированных закрытых систем, в том числе CliniMACS Prodigy® (Miltenyi Biotec) и Cocoon® (Lonza), требует меньшие площади чистых помещений производства, а также количество персонала задействованного в производстве каждого CAR T продукта [40, 43] (**Рис. 2.4**).



Рисунок 2.4. Существующие платформы и реакторы для производства CAR T клеток - G-Rex® (Wilson Wolf), Z®RP (Zellwerk, Xuri®), WAVE® (Cytiva), CliniMACS Prodigy® (Miltenyi Biotec), Cocoon® (Lonza), и Quantum® (Terumo).

В автоматизированных системах производства продукт афереза проходит через этапы выделения популяции Т клеток, активации, трансдукции и экспансии CAR Т клеток внутри изолированного одноразового контура (**Рис. 2.5**). Отбор проб и добавление реагентов или сред осуществляются через стерильные асептические порты доступа, что позволяет поддерживать так называемую «функционально закрытую систему».

Современные системы биореакторов могут использовать лентивирусный генный вектор или невирусные векторы для модификации Т клеток, которую также проводят внутри закрытой автоматизированной установки [60]. Конечный продукт часто получают в более сжатые сроки (обычно 7–10 дней против 14 дней) и дешевле, чем при централизованном производстве [39, 40, 43, 45, 52, 61, 62].

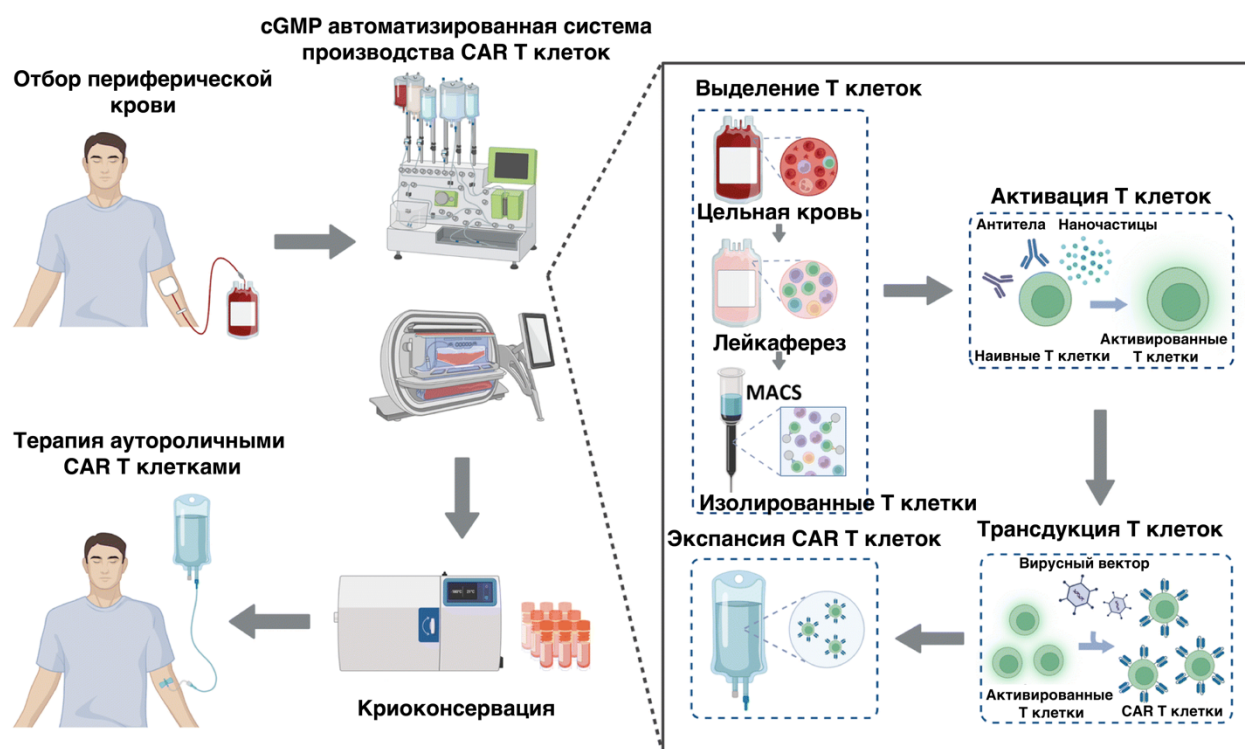


Рисунок 2.5. Процесс создания CAR Т клеточного продукта с помощью автоматизированных систем. Адаптировано из [63].

Автоматизированные системы имеют ряд преимуществ, например, позволяют проводить доклинические и клинические испытания в разных клиниках, увеличивая доступность терапии, тестировать новые CAR на пациентах, для которых данная терапия может быть “терапией последней надежды”, а также оптимизировать CAR Т клеточный продукт для каждого пациента.

2.3 Проплиферация и экспансия и CAR Т клеток *in vivo*

Т клетки, модифицированные химерным антигенным рецептором, являются “живым лекарством”, изготавливаемым для каждого пациента индивидуально. После введения CAR Т клетки должны размножиться, занять соответствующие ниши в иммунной системе и персистировать пока не будут уничтожены опухолевые клетки. К сожалению, на сегодняшний день, адоптивная иммунотерапия CAR Т клетками применяется после традиционных методов лечения, таких как химио- или радиотерапия. К этому времени опухолевые клетки проходят трансформацию и становятся более устойчивыми,

“агрессивными”, и могут распространиться в новые ниши организма. Все это приводит к тому, что рак на такой стадии труднее лечить. С другой стороны, в результате предыдущих этапов терапии, иммунная система пациента сильно истощена [46, 64]. В результате, для получения аутологичных CAR T клеток, довольно сложно получить исходную популяцию T клеток для производства высокофункциональных CAR T клеток [65]. В среднем, для одного из десяти пациентов не удастся получить качественный клеточный продукт [66-68]. Однако, даже в случае производства клеточного продукта, важную роль в успехе терапии играет фенотипический и популяционный состав CAR T клеток [69-71]. В ранних работах было показано, что при равном соотношении популяций CD4 и CD8 T клеток можно получить хороший противоопухолевый ответ [72, 73]. Как следствие, данный состав CAR T клеток стал стандартом при производстве продукта Kymriah (CAR19 T клетки). Во время производства CAR T клеток, CD4 и CD8 растут с разной скоростью, поэтому на финальной стадии их соотношение корректируют. С другой стороны, состояние пациента, предыдущие линии терапии и процесс производства клеток могут сильно повлиять на фенотип CAR T клеток [74, 75]. В процессе своего развития T клетки переходят из наивных клеток T_{naive} в клетки памяти (T_{scm} , T_{cm} и T_{em}) и, в итоге, становятся терминально дифференцированными T_{emra} (**Рис. 2.6**). С одной стороны, наивные клетки обладают высоким потенциалом деления что важно для длительной персистенции CAR T клеток. Однако, CAR T клетки с терминально-дифференцированным фенотипом лизируют опухолевые клетки эффективнее всего [76]. Такую популяцию клеток называют “истощенными”, но важно отметить, что это означает потерю функциональной активности, скорее наоборот. Эволюционно, для предотвращения осложнений, связанных с продолжительной активностью каждого клона T клетки, в них заложены механизмы защиты организма с помощью ингибиторных рецепторов PD-1, CTLA-4, и TIM-3 и их лигандов [77, 78]. Длительная стимуляция иммунных клеток, например при хронических инфекциях или онкологических заболеваний, может привести к тому, что большинство T клеток будут иметь терминально-дифференцированный фенотип [79, 80].

Данные терапии пациентов с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) подтвердили, что высокое содержание CAR T клеток с наивным фенотипом прямо коррелирует с вероятностью полной ремиссии пациентов и наоборот [70, 80-82].

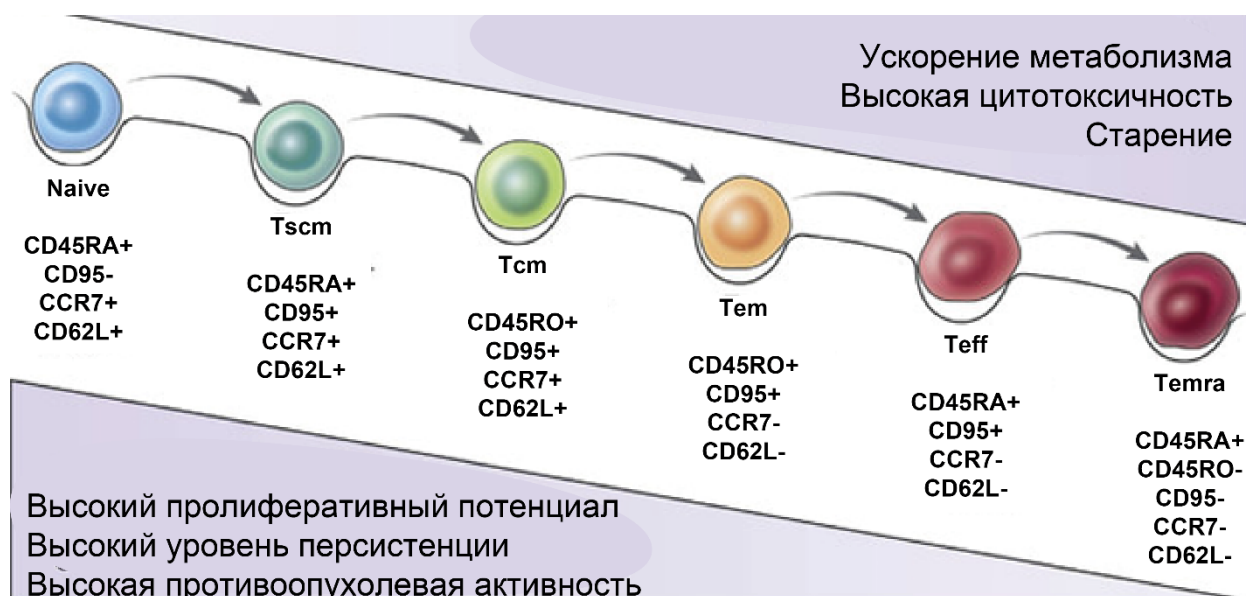


Рисунок 2.6. Этапы дифференцировки Т клеток (адаптировано из [83]).

Для проведения эффективной лентивирусной трансдукции Т клетки необходимо активировать, в результате чего на поверхности клеток повышается уровень рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR), с которым связывается VSV-G лентивирусных частиц. В результате, Т клетки получают сигналы к активации и пролиферации, что неизбежно приводит к изменению фенотипа. Как итог, чем меньшее время занимает процесс производства CAR Т клеток перед введением, тем выше их терапевтический потенциал [81, 84]. Изначально, для производства CAR Т клеток применяли ИЛ-2 [85, 86], но со временем, для замедления перехода Т клеток в сторону истощенного фенотипа [81, 87, 88] стали использовать другие цитокины – ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-18 или ИЛ-21. На сегодняшний день, наиболее распространенной является комбинация цитокинов ИЛ-7 и ИЛ-15 [81], которая позволяет сохранить большой процент CAR Т клеток с фенотипом T_{scm}.

Помимо цитокинов, для активации Т клеток используют антител, специфичные к CD3 и CD28, которые связывают рецепторы на поверхности клетки и имитируют сигналы, поступающие в Т клетку при распознавании антигена TCR [70]. Изначально, антитела для активации сорбировали на культуральном пластике [89], затем были разработаны магнитные частицы [90], покрытые антителами и другие искусственные частицы [91]. Основными недостатками данных подходов является стимуляция всех клеток в культуре, а не только CAR Т клеток, и сильные отличия в биомеханике активации рецепторов по сравнению с TCR [92-94]. Поэтому, в некоторых производствах CAR Т клеток используют фидерные клетки, несущие антиген CAR [95, 96], которые позволяют стимулировать только CAR-положительные клетки и обеспечивают необходимые сигналы, поступающие в клетку [97, 98]. Однако, высокие требования к биобезопасности и контаминации клеточного

продукта перед введением пациенту существенно затрудняют распространение применения фидерных клеток в клинической практике.

2.3.1 *CD45RA-негативные аллогенные CAR T клетки*

Одним из основных маркеров при дифференциации фенотипов популяций Т клеток является тирозиновая фосфатаза CD45, кодируемая геном *PTPRC*, в который входит 35 экзонов [99], три из которых (4–6) имеют гомологичные энхансеры и сайленсеры альтернативного сплайсинга пре-мРНК [100, 101]. Несмотря на теоретически большое разнообразие возможных вариантов, у человека обнаружены только шесть изоформ CD45: CD45RO (3-7-8), CD45RA (3-4-7-8), CD45RB (3-5-7-8), CD45RAB (3-4-5-7-8), CD45RBC (3-5-6-7-8) и CD45RABC (3-4-5-6-7-8) (**Рис. 2.7 А**). Изоформы CD45 представлены на всех клетках гемопоэтического происхождения (за исключением безъядерных эритроцитов и тромбоцитов), причем количество CD45 коррелирует со степенью дифференцировки клеток.

Внеклеточная часть CD45 состоит из пяти структурных областей. N-Концевая область вытянута и сильно гликозилирована. Именно она определяет изоформу рецептора. Остальные участки внеклеточного домена CD45, общие для всех изоформ, – это три домена фибронектина типа III и область, содержащая пять консервативных остатков цистеина. Важно отметить, что изоформа CD45 регулирует чувствительность Т клеток к активации при распознавании антигена. Предполагают, что из-за большого объема и структурной «жесткости» CD45 выталкивается из центральной области при формировании иммунологического синапса (ИС) при сближении мембран антигенпрезентирующих (АПК) и Т-клеток (**Рис. 2.7 Б**). Количество и тип изоформ CD45 в Т клетках изменяются в зависимости от степени их дифференцировки – в наивных и покоящихся клетках преимущественно представлены более крупные изоформы CD45. В свою очередь, активированные Т клетки синтезируют изоформы CD45, в которых отсутствует большинство или все домены, кодируемые вариabельными экзонами. Гликопротеин CD45 содержит один трансмембранный домен и три внутриклеточных: клиновидный, D1 и D2 [102, 103].

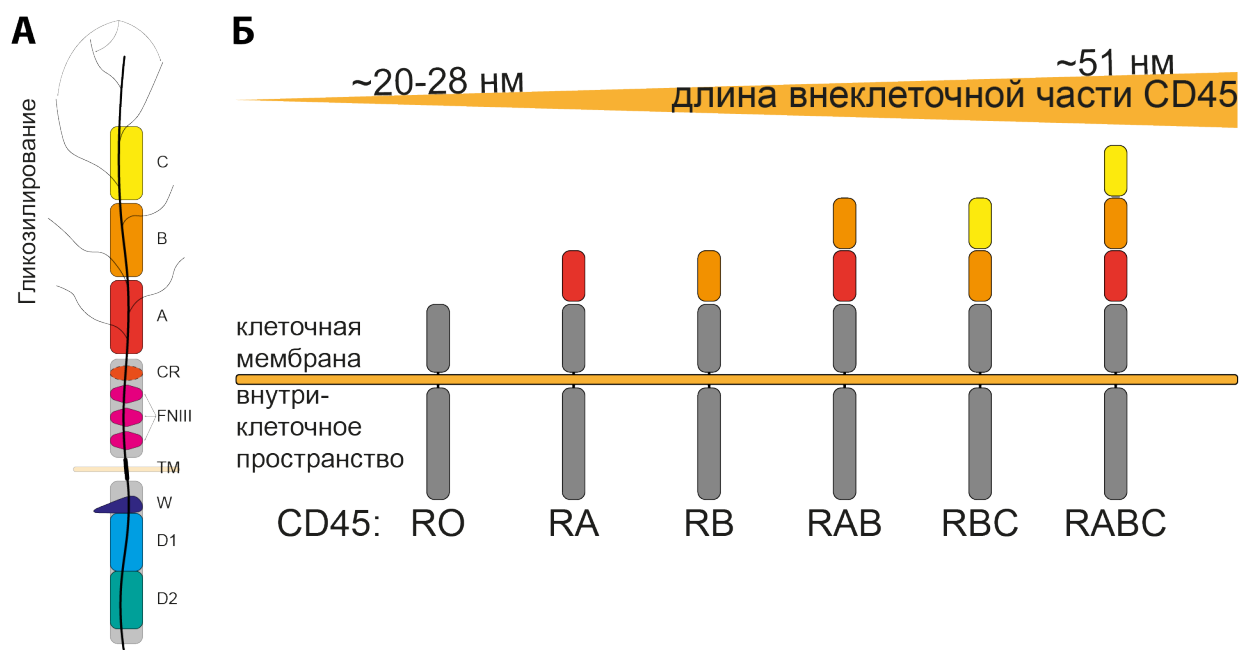


Рисунок 2.7. Структура и изоформы CD45 (адаптировано из [104]). А. А, В, С – внеклеточные участки CD45, определяющие изоформу белка; CR (cysteine rich region) – область, содержащая пять консервативных цистеинов; FNIII (fibronectin type III) – домены фибронектина типа III; TM – трансмембранный домен; W (wedge-like) – клиновидный домен; D1 – домен с фосфатазной активностью; D2 – домен, также необходимый для функционирования CD45 в клетке. Б. Обнаруженные изоформы CD45.

Участие CD45 в активации клеток иммунной системы впервые было продемонстрировано для сигнального каскада Т клеточного рецептора (ТКР). Анализ Т клеток, не экспрессирующих CD45, показал, что эта фосфатаза важна на начальной стадии передачи сигнала от ТКР [105] (**Рис. 2.8**). В неактивированной Т клетке CD45 дефосфорилирует тирозинкиназу Lck (Protein tyrosine kinase, PTK) и субъединицу CD3 ζ комплекса CD3/ТКР. Lck – основной субстрат фосфатазы CD45, которая может дефосфорилировать как ингибирующий тирозин (Y505) на С-конце киназы, так и активирующий тирозин (Y394) [104, 106]. При дефосфорилировании ингибирующего тирозина Y505 CD45 конкурирует с тирозинкиназой Csk, которая ингибирует Lck [107]. А. Courtney с коллегами исследовали двоякую функцию фосфатазы и пришли к выводу, что CD45 регулирует силу и частоту поступающего через ТКР сигнала, действуя на разные субстраты. Изменяя активность CD45, они обнаружили, что фосфатаза поддерживает значительное количество Lck в активном состоянии, но препятствует активации CD3 ζ . Детальное изучение динамики формирования иммунного синапса показало, что перед активацией комплекс ТКР имеет неактивную конформацию и не взаимодействует с главным комплексом гистосовместимости (Major histocompatibility complex, МНС) I или II класса. В это время CD45 ингибирует привлечение киназы Csk [108], а также дефосфорилирует CD3 ζ и Lck (**Рис. 2.8 А**). При взаимодействии клеток молекулы CD45 и Lck сначала привлекаются в центральный надмолекулярный кластер активации (Central supramolecular activation cluster, cSMAC) с помощью ТКР.

Однако в процессе формирования ИС, CD45 «выталкивается» в дистальный надмолекулярный кластер активации (Distal supramolecular activation cluster, dSMAC) (**Рис. 2.8 Б**) [109]. По-видимому, исключение CD45 из ИС связано с размерами молекулы, а также с высоким гликозилированием и сialiрованием (при этом сокращение эктодомена CD45 увеличивает совместную локализацию фосфатазы и ТКР и снижает активность последнего) [109]. Кроме того, удаление CD45 из центра ИС необходимо, чтобы в центральной части синапса равновесие сдвинулось в сторону киназ. В результате изменения баланса возможным становится фосфорилирование CD3 ζ , что обеспечивает проведение сигнала активации ТКР. Для завершения цикла активации в области ИС начинают скапливаться молекулы Csk и изоформа CD45RO, которая постепенно проникает в центральную область ИС и смещает равновесие между киназами и фосфатазами в сторону фосфатаз, дефосфорилирует CD3 ζ и активирующий тирозин Lck (**Рис. 2.8 В**). Сигнал ослабевает и состав изоформ CD45 меняется в сторону увеличения их длины и объема, а Lck снова возвращается в состояние базальной активности. Видимо, за счет такого механизма регуляции ТКР CD45 препятствует спонтанной активации Т клеток, предотвращая гиперактивацию и ее негативные последствия [110], индуцированные низкоаффинными антигенами или в отсутствие антигена.

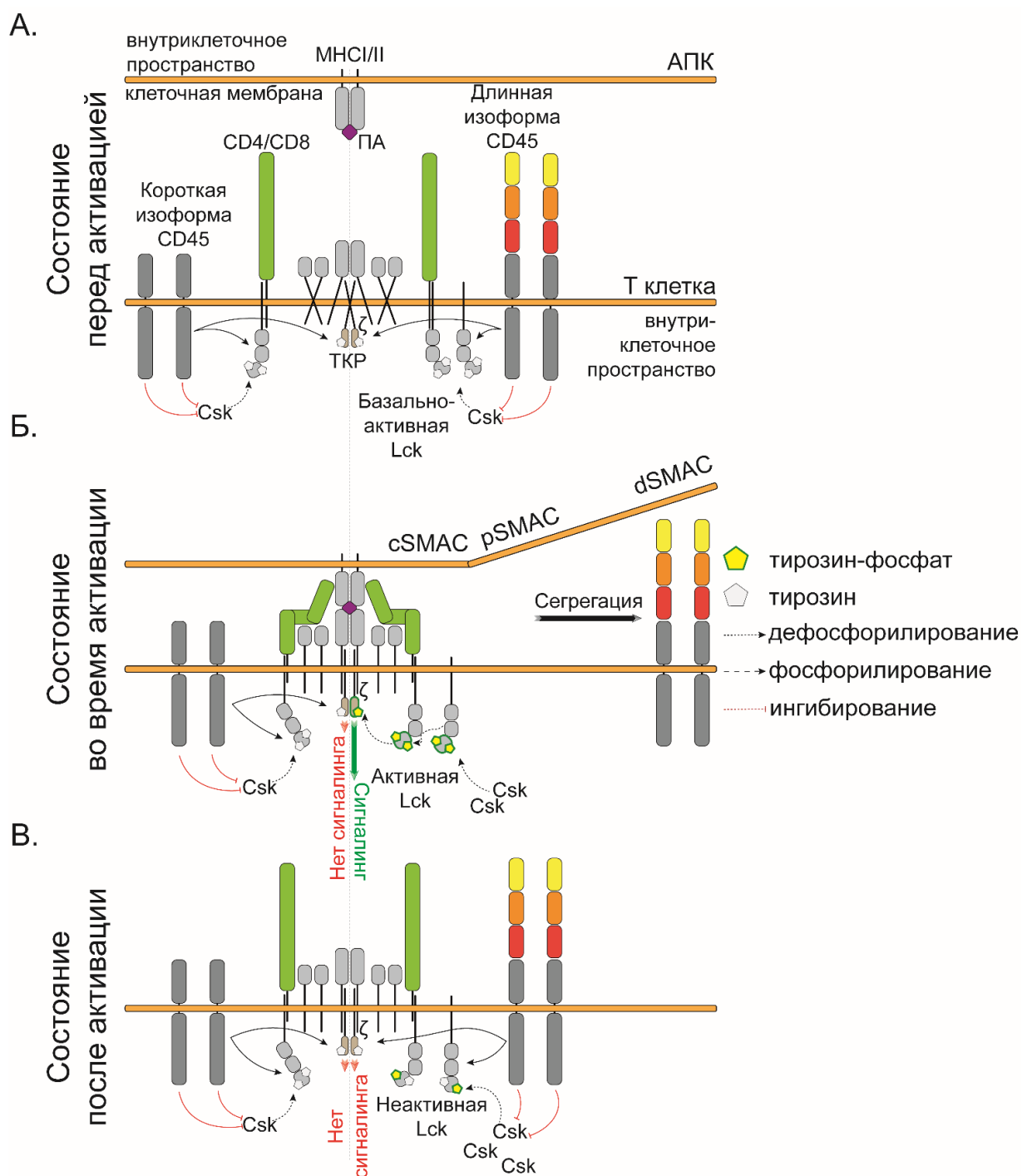


Рисунок 2.8. Участие CD45 в регуляции иммунного ответа. МНСI/II (Major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости I или II класса; АПК – антигенпрезентирующая клетка; ПА – презентируемый антиген; ζ – CD3 ζ ; ТКР – Т клеточный рецептор; Lck, Csk – протеинкиназы; cSMAC, pSMAC, dSMAC (central, peripheral, distal supramolecular activation clusters) – центральный, периферический, дистальный надмолекулярный кластеры активации. Адаптировано из [104].

Как уже упоминалось ранее, популяционный состав CAR T клеток напрямую влияет на персистенцию Т клеток, возникновение осложнений у пациентов и эффективность терапии. У большей части пациентов с диагнозом острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ) высок риск рецидива даже после нескольких раундов химиотерапии или аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК, allo-HSCT).

Использование аутологичных лимфоцитов для производства CAR T клеток осложнено количеством и функциональным состоянием T клеток пациента. С другой стороны, T клетки здоровых доноров позволяют получить клеточный продукт высокого качества, однако их применение связано с высоким риском реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Комбинированная терапия алло-ТГСК с последующим введением анти-CD19 CAR T клеток показала высокую эффективность на пациентах с В-ОЛЛ [111-113], но также была ассоциирована с серьезными гематологическими осложнениями [114]. Причина в том, что обычно CAR T клеточный продукт производят из общего пула T лимфоцитов донора, включая наивные, эффекторные и клетки центральной [115, 116]. Как уже упоминалось ранее, при применении аутологичных CAR T клеток, высокое содержание наивных T лимфоцитов ассоциировано с высокой эффективностью терапии. Однако, в случае аллогенных T клеток, широкий изначальный репертуар T клеточных рецепторов наивных T лимфоцитов [117, 118] ($CD45RA^+CD62L^+$) может привести к формированию иммунного ответа в отношении здоровых тканей и органов реципиента и развитию реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [119-125]. С другой стороны, T клетки памяти уже прошли клональную антигенную селекцию, имеют меньшее разнообразие TCR и, как следствие, несут меньше рисков развития РТПХ [119-125], при этом клетки памяти обладают высокой цитотоксичностью [124, 126]. В экспериментах на животных моделях было показано, что CAR Tm клетки (CAR T клетки полученные из клеток памяти) эффективно уничтожают опухолевые клетки, а также не развивают РТПХ [127, 128]. Таким образом, для пациентов с низким качеством собственных T клеток или рефрактерной формой заболевания применение CAR Tm клеток может оказаться эффективным способом терапии с низким риском развития РТПХ. Однако, для полноценной оценки эффективности применения CAR Tm клеток необходимо проведение клинических испытаний.

2.4 Выбор антигенов для CAR T клеточной терапии

Отличительной особенностью CAR T клеток, обнаруженной уже при первых клинических испытаниях, оказалась высокая эффективность клеточной терапии. После введения, модифицированные T клетки продемонстрировали экспоненциальный рост численности и активную элиминацию опухолевых клеток в течение нескольких недель [129]. Обратной стороной высокоэффективной терапии является повышенный риск возникновения системных и опасных для жизни побочных реакций, в первую очередь, гиперцитокинемии (цитокиновый шторм, синдром выброса цитокинов (CRS)), а также синдрома лизиса опухоли [56, 81]. Данные осложнения могут провоцировать развитие синдрома полиорганной недостаточности и, как следствие, привести к летальному исходу.

Купировать осложнения, вызванные Т клетками можно кортикостероидами [130], что, однако, приводит к подавлению всех Т клеток, и имеет ряд побочных эффектов [69, 131]. Поэтому для безопасной и эффективной терапии с помощью CAR Т клеток основным вопросом является выбор подходящего антигена. Идеальная мишень для CAR должна присутствовать во всех опухолевых клетках и локализована на их поверхности в количествах, достаточных для активации CAR. Опухолевый антиген не должен экспрессироваться на здоровых тканях и органах для предотвращения неспецифической токсичности (антиген имеется не только на опухолевых, но и на неопухолевых клетках; on-target off-tumor toxicities), а также эффекторных клетках, несущих CAR (например Т клетках, для предотвращения перекрестной токсичности между CAR клетками). Еще одним важным параметром при выборе является роль антигена в развитии опухоли и его стабильность, потеря антигена приведет формированию опухоли устойчивой к адоптивной иммунотерапии.

Несмотря на большое количество публикаций и клинических испытаний, на сегодняшний день все аутологичные CAR Т продукты, одобренные FDA, нацелены всего на две мишени – CD19 и BCMA [132]. Одной из основных причин распространенности CD19 CAR и BCMA-CAR Т клеток является их высокая эффективность и возможность компенсировать потерю здоровых В клеток с помощью введения препаратов иммуноглобулинов (IVIg). Однако, важно упомянуть, что длительная аплазия В-клеток после CAR Т клеточной терапии также не обходится без негативных последствий [133]. Несмотря на высокую эффективность CD19 CAR Т клеток 49% пациентов не достигают долгосрочной ремиссии в перспективе трех лет [65]. Пациентов с CD19-негативными рецидивами можно лечить с помощью CAR специфичных к CD22 или CD20, но эти мишени также подвержены потере антигена при иммунотерапии [134, 135]. На сегодняшний день в качестве новых мишеней для CAR Т терапии опухолей В клеточного происхождения предлагаются CD79b, BAFF-R, CD37, CD72, ROR1, TSLPR, CD70, CD74, CD32b, В-клеточный рецептор, каппа и лямбда легких цепей иммуноглобулинов В-клеточного рецептора и др [136, 137].

Т-клеточные лейкозы и лимфомы охватывают широкий спектр фенотипически зрелых и незрелых новообразований и являются отдельной группой гематологических заболеваний для терапии CAR Т клетками [138]. В отличие от В-клеточных злокачественных новообразований, развитие иммунотерапии Т клеточных новообразований происходит медленно. Как и в случае с острым миелоидным лейкозом ОМЛ, основной проблемой является отсутствие подходящих опухолевых антигенов. Более того, если аплазию В-клеток можно компенсировать инфузиями иммуноглобулина, то

эквивалентной терапии для замены функции Т клеток не существует. Так как перед введением CAR Т клеток пациенты проходят курс химио- и радио- терапии, производство аутологичного продукта значительно осложняется качеством и количеством стартовой популяции Т клеток, а также с повышенным риском контаминации CAR Т клеток злокачественными клетками [139-141]. Еще одна проблема, уникальная для Т клеток, заключается в том, что целевые антигены часто являются общими для эффекторных CAR Т клеток, что приводит к перекрестной токсичности между CAR клетками, которая может повлиять как на производство, так и на персистенцию клеток CAR Т в пациенте [142]. На сегодняшний день существует несколько подходов для предотвращения перекрестной токсичности CAR клеток при терапии опухолей Т клеточного происхождения: таргетировать антигены экспрессия которых снижается во время экспансии CAR Т клеток (например, CD5) [143, 144]; таргетировать антигены, которые экспрессируются определенной популяцией Т клеток (например, CD4 [145], CD30 [146, 147] или CCR4 [148]), тем самым сохраняя остальные подмножества CAR Т клеток; генетическое редактирование CAR Т клеток *ex vivo* для нарушения экспрессии таргетируемого CAR антигена [142, 149]; ко-экспрессией внутриклеточных блокаторов, которые перехватывают антигена внутри CAR Т клетки и не дают ему экспонироваться на мембране [150]; использованием CAR клеток другого происхождения, например НК клеток [151, 152].

В области терапии солидных опухолей существенной проблемой применения CAR Т клеток является неспецифическая цитотоксичность, которая особенно актуальна из-за отсутствия широкого выбора возможных опухолевых антигенов (tumor associated antigens, ТАА) [153]. Хотя количество ТАА, экспрессируемых в нормальных клетках, существенно ниже, чем в опухолевых клетках, CAR Т клетки могут распознавать нормальные клетки с низкой экспрессией антигена из-за высокой чувствительности. Сейчас идут клинические испытания CAR Т клеток, специфичных к рецептору эпителиального фактора роста человека-2 (HER2), рецептору эпидермального фактора роста (EGFR), CD276 (B7-H3), CD133, клаудину 18.2, раковому эмбриональному антигену (CEA), карбоангидразе IX (CAIX), мезотелину и ганглиозиду 2 (GD2), однако все эти антигены демонстрируют обнаруживают в малых количествах и в нормальных тканях [154, 155]. Например, попытка клинического применения CAIX CAR Т клеток для терапии пациентов с диагностированной карциномой почек привела к серьезным осложнениям, связанным с цитотоксичностью по отношению к клеткам печени [156]. В исследовании терапевтический эффективности химерного антигенного рецептора, специфичного к HER2, для лечения метастатического рака толстой кишки, сразу после инфузии CAR Т клеток в легких

возникла интенсивная кросс-реакция на здоровые клетки, экспрессирующие HER2 в малых количествах, что привело к гибели пациента [157].

2.4.1 Химерные рецепторы, содержащие лиганды опухолевых и аутореактивных клеток

Отдельным классом химерных рецепторов можно считать аутоантигенные рецепторы (chimeric autoantigenic receptor, CAAR). Данные рецепторы предлагается применять для терапии аутоиммунных заболеваний путем специфической элиминации аутореактивных В клеток. В отличие от обычных CAR, внеклеточный домен CAAR состоит из конформационных эпитопов аутоантигенов, действующих как мишень для распознавания рецепторами аутореактивных В-клеток. Применимость данного подхода была показана на животных моделях аутоиммунных заболеваний: вульгарной пузырчатки с использованием Т клеток CAAR, узнающих десмоглеин 3 [158]; миастении с использованием Т клеток CAAR, направленных на мышечно-специфическую тирозинкиназу [159]; аутоиммунного энцефалита с использованием Т клеток CAAR к фрагменту глутаматного NMDA-рецептора [160]; мембранозной нефропатии с помощью CAAR к фрагментам рецептора 1 фосфолипазы A2 (PLA2R1) и белка 7A, содержащего тромбоспондиновый домен 1 типа [161]. Кроме того, предприняты попытки терапии рассеянного склероза с использованием CAAR Т клеток к фрагменту основного белка миелина [162].

Помимо антител и аутоантигенов, для распознавания опухолевых клеток CAR Т клетками можно использовать цитокины (ИЛ-10 [163], ИЛ-11 [164], ИЛ-13 [165]), факторы роста клеток (ГМ-КСФ [166]) и другие лиганды рецепторов на поверхности опухолевых клеток (тромбопоэтин [167], аднектин [168], CD27 [169], APRIL [170], FLT3L [171] и др. [165]). CAR Т клетки содержащие мутантную форму ИЛ-13 (мутеин) показали свою эффективность в рамках академических клинических испытаний [172] (NCT00730613) и теперь находятся на стадии клинических испытаний для терапии глиомы (NCT02208362, NCT04661384)

С другой стороны, для опухолей В и Т клеточного происхождения одним из вариантов специфической CAR Т клеточной терапии могут быть рецепторы, направленные против поверхностных иммуноглобулинов. Для ряда гематологических опухолей (В-НХЛ, ХЛЛ, Т-ОЛЛ) характерна моноклональная экспансия ракового клона, который экспрессирует В или Т клеточный рецептор. CAR Т клетки направленные на определенную последовательность вариабельных доменов опухолевых иммуноглобулинов на поверхности опухолевых клеток позволит сохранить нормальные лимфоциты, тем самым уменьшая негативное влияние на гуморальный иммунитет пациента.

2.4.2 Лимфодеплеция гемопоэтических клеток с помощью CAR T клеток

Рецидив после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) остается основной причиной смертности у пациентов с В-ОЛЛ [173]. Традиционные методы лечения, такие как химиотерапия, инфузия донорских лимфоцитов и повторная трансплантация при рецидиве после алло-ТГСК недостаточно эффективны [174, 175]. Введение CD19 CAR T клеток пациентам с В-ОЛЛ с рецидивом после алло-ТГСК приводило к полной ремиссии у 85,7–93,8% [176-181]. Полученные результаты привели к новому формату применения CAR T клеток – сочетанной терапии или “bridging therapy” при которой пациенту вводятся CAR T клетки до или после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. С другой стороны, в доклинических исследованиях уже была показана высокая эффективность миелоабляции гематопоэтических стволовых клеток и предшественников с помощью CD117, CD33 и CD123 специфичных CAR T клеток [115, 182-185]. Все данных антигенов был, в некоторой степени, компромиссным решением, так как ограничивал область применения адоптивной иммунотерапии мишенями отсутствующими на поверхности самих CAR T клеток.

Успешность алло-ТГСК связана с эффективностью кондиционирования пациента, а также с максимальной элиминацией опухолевых клеток. Поэтому, необходим антиген, отсутствующий на клетках остальных тканей и, вместе с тем, охватывающий как можно больше популяций гемопоэтических клеток, включая Т лимфоциты. Таким антигеном можно считать CD45, который представлен на подавляющем большинстве лейкозов и лимфом [104, 186] и всех клетках гемопоэза, за исключением зрелых эритроцитов и тромбоцитов [186, 187] (**Рис. 2.9**).

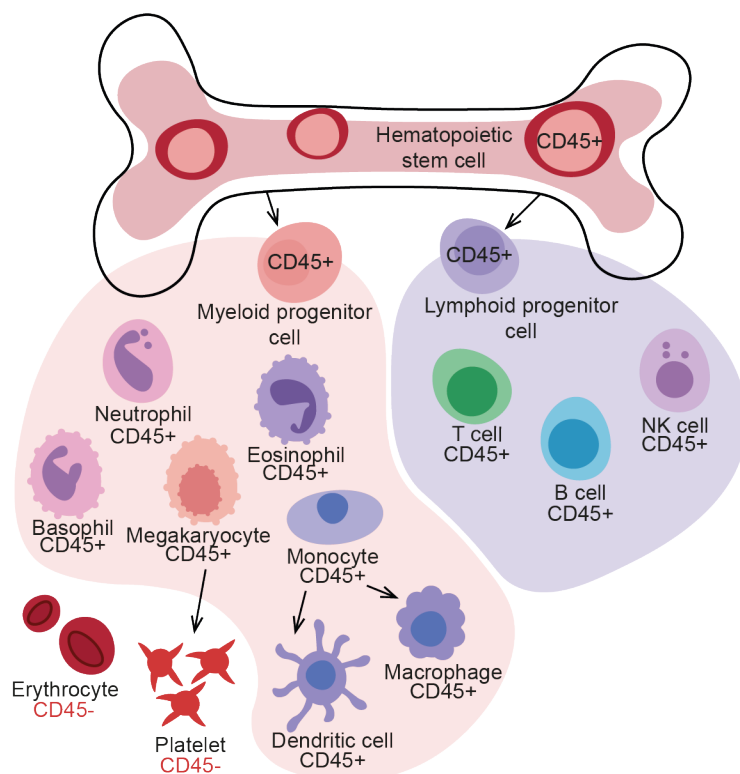


Рисунок 2.9. Представленность CD45 на гемопоэтических клетках.

В последние десятилетия было предложено множество вариантов элиминации CD45-положительных клеток с помощью антител, иммунотоксинов и конъюгатов антител с цитотоксическими агентами (ADC) [188-196]. Учитывая многообещающие результаты применения CAR T клеток специфичных к CD117, CD33 и CD123, и распространённость антигена, создание тканеспецифичных CAR T клеток для элиминации CD45-положительной популяции выглядит крайне привлекательной и актуальной задачей. Ранее, получение CD45 CAR T клеток было ограничено проблемой кросс-цитотоксичности CAR клеток по отношению друг к другу. Однако, развитие технологий редактирования генома позволило сначала получить CD5-специфичные T клетки с нокаутом гена CD5, которые оказались устойчивыми к кросс-цитотоксичности, и стали новым направлением в иммунотерапии лейкемии [143]. Недавние исследования продемонстрировали возможность создания устойчивых к кросс-цитотоксичности CAR, нацеленных на CD3 [149], CD5 [143, 197] и CD7 [142, 198-201] (биспецифический CD5/CD7 [198]) и CD38 [202, 203]. Некоторые из этих подходов находятся на ранних стадиях клинических испытаний и показывают обнадеживающие результаты (NCT04004637, ChiCTR2000034762 и NCT03690011; Clinicaltrials.gov).

В отличие от CD3, CD5, CD7 и CD38, нокаут CD45 может нарушить способность к активации CAR T клеток, так как внеклеточная часть и фосфатазная активность CD45

играет важную роль в формировании иммунного синапса и передаче сигнала TCR. Как и в случае TCR, передача сигнала активации химерных рецепторов основана на изменении баланса киназ и фосфатаз после формирования иммунного синапса. В экспериментах *in vitro* была показана корреляция между интенсивностью передачи сигнала и размером внеклеточного домена CAR, аффинностью по отношению к антигену и CD45 [204]. Использование более длинного шарнирного домена в CAR приводило к усилению передачи сигнала, в то время как более короткие варианты CAR менее эффективно сегрегировали CD45 из иммунного комплекса и хуже передавали сигнал к активации. Однако, при проведении экспериментов *in vivo* самими эффективными оказались CAR Т клетки содержащими самый короткий шарнир на основе короткого пептида из CD8a. Также важно отметить, что формирование иммунного синапса CAR сильно отличается от TCR [205], поэтому как будет функционировать CAR Т клетка без CD45 неизвестно. Вероятно, негативное влияние нокаута CD45 на модифицированные Т клетки может быть компенсировано более быстрым формированием иммунного синапса и интенсивным сигналом от CAR [206].

2.5 Подходы к увеличению безопасности CAR Т клеточной терапии

Длительная или избыточная активность CAR Т клеток может привести к чрезмерному высвобождению цитокинов и гиперактивации иммунной системы [207]. Синдром выброса цитокинов (cytokine release syndrome, CRS) является характерным осложнением после введения CAR Т клеток, в некоторых клинических исследованиях частота CRS 3-й степени и выше достигала 30% [208, 209]. CRS характеризуется повышенными уровнями интерферона- γ (ИНФ γ), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 или фактора некроза опухоли- α [210]. Симптоматически CRS может выражаться в лихорадке, гипоксии, терминальной дисфункции органов, цитопении, гипотонии, энцефалопатии, нарушении коагуляции, гемофагоцитарном лимфогистиоцитозе и нарушением целостности гематоэнцефалического барьера [211, 212]. Для увеличения безопасности терапии было предложено множество способов, позволяющих снизить или полностью ингибировать функцию CAR Т клеток после введения пациенту при обнаружении соответствующих биомаркеров и нежелательных симптомов (Рис. 2.10).

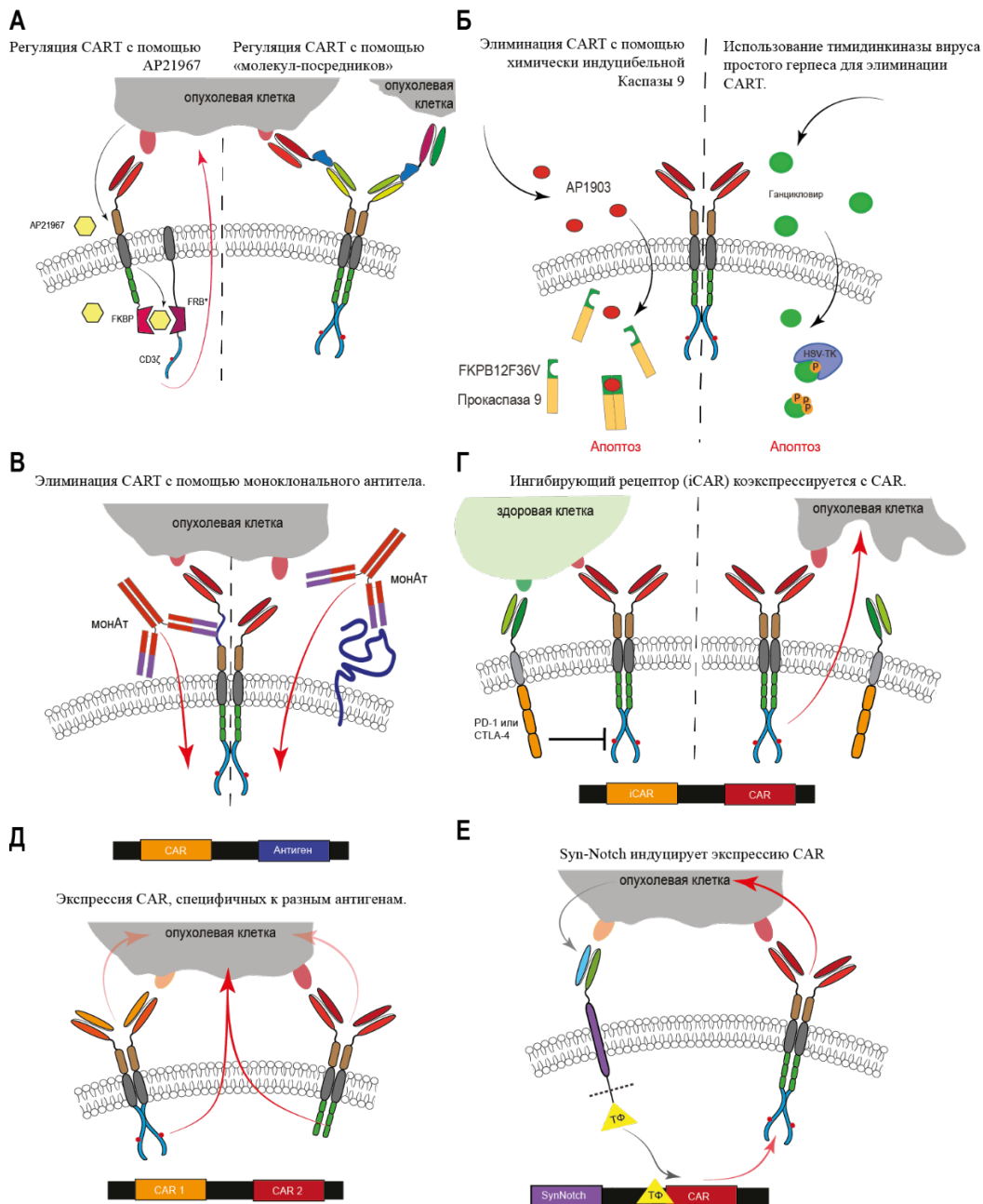


Рисунок 2.10. Подходы к увеличению безопасности CAR T клеточной терапии.

А) Контроль передачи сигналов активации CAR T клеток с помощью разделения этапов распознавания антигена и передачи сигнала активации. Б) Элиминация CAR T клеток посредством экзогенных молекул. В) Элиминация CAR T клеток с помощью моноклональных антител. Г) Подавление цитотоксичности CAR T клеток, если ингибирующий ко-рецептор iCAR взаимодействует с антигеном здоровых клеток. Д) Применение методов синтетической биологии, при котором взаимодействие synNotch рецептора с одним антигеном индуцирует экспрессию CAR. Е) Для активации CAR T клетки необходимо взаимодействие двух CAR с двумя опухолевыми антигенами.

2.5.1 Контроль активации химерного антигенного рецептора

Уничтожение опухолевых клеток с помощью CAR включает два этапа - распознавание опухолевого антигена и передачу сигнала активации. Для контроля интенсивности передачи сигнала от распознающего домена к сигнальному необходимо разделить эти этапы между собой. Один из способов контроля активации заключается в

разделении CAR на два независимых рецептора содержащие домены гетеродимеризации FKBP и FRB, которые связываются между собой в присутствии рапамицина или его аналогов (рапалогов), например AP21967 [213, 214] (**Рис. 2.10 А**). В результате, цитотоксичность CAR Т клеток зависит от концентрации низкомолекулярных соединений. Анализ эффективности CAR Т клеток *in vitro* и *in vivo* показал, что регулируемые CAR с доменами химической димеризации и обычные CAR не отличаются по своим свойствам. Однако, клиническое применение данного подхода ограничено высокой сложностью синтеза рапалогов, иммуносупрессивными свойствами рапамицина [215], побочными эффектами [216, 217] и неравномерным распределением низкомолекулярных соединений в организме [218, 219].

С другой стороны, для контроля активации Т клеток можно использовать адаптерные молекулы, которые одной частью взаимодействуют с опухолевым антигеном, а другой с CAR. Модульные, или универсальные, химерные рецепторы позволяют контролировать чувствительность Т клеток к уровню экспрессии опухолевого антигена, а также менять специфичность CAR [220, 221]. Такой подход позволяет расширить количество таргетируемых антигенов при использовании универсального CAR, а дозирование “молекул-посредников” позволяет регулировать интенсивность CAR-Т клеточного ответа и не допускать гиперцитокинемии или синдрома лизиса опухоли [222]. В отдельной главе будут рассмотрены существующие варианты модульных CAR и их особенности.

2.5.2 Элиминация CAR Т клеток с помощью низкомолекулярных соединений и моноклональных антител

Более радикальным подходом к предотвращению осложнений, связанных с терапией CAR Т клетками, является их уничтожение. Для этого Т клетки помимо CAR экспрессируют дополнительные “суицидальные” белки. На сегодняшний день, при проведении клинических испытаний новых CAR, активно используют химически-индуцируемые проапоптотические рекомбинантные белки для контролируемого запуска апоптоза у CAR Т клеток [223]. Самым распространенный вариант представляет собой химерную каспазу-9 (iCasp9) [224], состоящую из двух ключевых компонентов: усеченного варианта каспазы-9 и фрагмента FK506-связывающего белка. Данный химерный белок димеризуется в присутствии препарата римидуцид (AP1903), что приводит к запуску апоптотического каскада (**Рис. 2.10 Б**). Основным преимуществом iCasp9 является скорость – введение AP1903 приводит к элиминации CART в течение нескольких часов.

Помимо каспаз для удаления CAR Т клеток предложено использовать тимидинкиназу вируса простого герпеса (HSV-tk). Использование ганцикловира и клеток

несущих ген тимидинкиназы, является изученной и применяемой методикой элиминации модифицированных клеток, с доказанной безопасностью и эффективностью в клинических исследованиях. При введении ганцикловира, внутриклеточная HSV-tk фосфорилирует ганцикловир до монофосфата, который клеточные киназы последовательно превращают в дифосфат и трифосфат [225-227]. Далее трифосфатная форма ганцикловира встраивается в ДНК при элонгации и репликации, нарушая работу ДНК-полимеразы, что приводит к гибели клетки [228, 229]. Однако, у этого подхода есть недостатки, заключающиеся в иммуногенности вирусного белка HSV-tk [230] и недостаточной скоростью элиминации Т клеток [231].

Препараты антител применяемые для терапии аутоиммунных и онкологических заболеваний также могут быть использованы для элиминации CAR Т клеток в случае возникновении осложнений, вызванных клеточной терапией [232, 233]. Для того чтобы элиминировать Т клетки с помощью антител необходимо добавить соответствующий антиген на поверхность CAR Т клеток (**Рис. 2.10 В**). Наиболее распространенными вариантами таких антигенов являются CD20 [234, 235] и укороченная форма рецептора эпидермального фактора роста (tEGFR) [236]. Однако, при использовании препаратов ритуксимаб (анти-CD20) или цетуксимаб (анти-EGFR) следует учитывать собственную цитотоксичность антитела и возможные осложнения.

2.5.3 Экспрессия нескольких химерных антигенных рецепторов и комбинирование передаваемых сигналов

Как уже обсуждалось ранее, проблема подбора мишени, специфичной только для опухолевых клеток стоит давно, и для большего количества раковых клеток подобрать уникальные антигены крайне сложно. Однако, можно подобрать детерминированные паттерны антигенов, характерных для здоровых и опухолевых клеток. Ко-экспрессия CAR и дополнительного ингибирующего химерного рецептора специфичного к антигенам здоровых клеток (iCAR) содержащего внутриклеточные домены PD-1 или CTLA-4 защищает нормальные клетки от неспецифической цитотоксичности [237] (**Рис. 2.10 Г**). Основное преимущество iCAR заключается в обратимости ингибирования и позволяет CAR Т клеткам функционировать при следующей встрече с опухолевой клеткой. С другой стороны, применение iCAR осложнено гетерогенностью опухолей пациентов, аффинности ингибирующего рецептора к антигену, уровню экспрессии самого антигена на здоровых клетках, а также балансом соотношения CAR/iCAR.

Как альтернативу iCAR, для повышения избирательности и безопасности CAR Т клеток было предложено использовать два рецептора, специфичные к разным опухолевым антигенам. Сигнальные домены распределены между двумя CAR (у одного рецептора

может быть стимулирующий домен CD3 ζ , а у другого CD28) и для полноценной активации Т клетки необходимы сигналы от обоих рецепторов (**Рис. 2.10 Д**) [238, 239]. Однако, при использовании двойных CAR необходимо учитывать, что эффективность элиминации опухоли и пролиферации Т клеток будет напрямую зависеть от баланса сигналов двух рецепторов, оптимум которого находится в довольно узком диапазоне. Сильная разница в количестве двух целевых антигенов на опухолевой клетке, либо полное отсутствие одного может нивелировать эффективность клеточной терапии.

Еще одной стратегией стало применение методов синтетической биологии, при котором взаимодействие synNotch рецептора с одним антигеном индуцирует экспрессию CAR (**Рис. 2.10 Е**) [240]. Этот CAR в свою очередь связывается со своим антигеном на опухолевой клетке и активирует цитотоксичность этой CAR Т клетки. Благодаря такому механизму достигается высоко локализованное подавление опухолевых клеток без риска неспецифической цитотоксичности по отношению к здоровым тканям.

2.5.4 Применение мРНК для модификации Т клеток. Применение *in vivo* CAR.

Одним из способов ограничения экспрессии CAR является трансфекция Т клеток мРНК, кодирующей химерный антигенный рецептор [241]. Такой подход был успешно использован *in vitro* и *in vivo* для CAR специфичных к CD19 и мезотелину. Впоследствии, Т клетки модифицированные мРНК CAR, специфичного к мезотелину, были успешно применены для терапии пациентов с раком поджелудочной железы [242]. Электропорация клеток мРНК происходит *in vitro*, что позволяет избежать потенциально опасной интеграции вирусного или транспозазного вектора в геном Т клеток [243]. К сожалению, однократной инфузии мРНК CAR Т клеток недостаточно, что увеличивает стоимость и сложность лечения. С другой стороны, многократные введения CAR Т клеток позволяют регулировать количество персистирующих клеток и интенсивность терапии [242], избегая чрезмерного высвобождения цитокинов, синдрома лизиса опухоли и цитотоксичности против здоровых клеток.

Недавние доклинические исследования продемонстрировали возможность *in vivo* трансфекции Т клеток с помощью мРНК, инкапсулированной в липидные наночастицы, специфически связывающиеся с CD5 CAR. Внутривенное введение наночастиц приводило к формированию CAR Т клеток специфичных к белку активации фибробластов (FAP), которые элиминировали активированные фибробласты у мышей с моделированной травмой сердца вследствие перегрузки давлением [244]. Явным преимуществом описанного подхода является возможность исключения стадии элиминации Т клеток пациента для последующих генетических манипуляций. Это обстоятельство упрощает

одобрение такой терапии регулирующими организациями и применимость надлежащей практики, а также облегчает процесс получения CAR T клеток для пациента. Недостатком мРНК для модификации Т клеток является относительно невысокий уровень экспрессии CAR по сравнению с лентивирусной трансдукцией.

2.6 Модульные химерные антигенные рецепторы

Независимо от выбора антигена, введение пациенту CAR Т клеток с существенным потенциалом к делению и активации сопряжено с рисками связанными с избыточной активностью Т клеток. Химерный рецептор распознает антиген и немедленно активирует Т клетку, и это происходит в организме пациента с миллионами CAR Т клеток. После введения их количество увеличивается примерно в тысячу раз [35]. Данные процессы сложно контролировать или быстро остановить, что может привести к развитию синдрома выброса цитокинов, гиперактивации иммунной системы, истощению CAR Т клеток, и, как следствие, недостаточной эффективности терапии и рецидиву опухоли. Для повышения безопасности применения CAR Т клеток была предложена концепция разделения этапов распознавания антигена и передачи сигнала к активации через CAR с помощью адаптерных молекул. В данных системах адаптерная молекула (чаще всего белок) распознает антиген и, одновременной с этим, другая часть адаптера выступает в роли антигена для CAR. В результате CAR может распознавать опухолевые клетки и передавать сигналы активации только при наличии медиатора между CAR Т клеткой и опухолевыми клетками. Также, разделение этапов распознавания и уничтожения опухолевых клеток с помощью адаптерных молекул позволяет настраивать чувствительность CAR Т лимфоцитов к количеству опухоль-ассоциированного антигена на поверхности клеток и лучше дифференцировать опухолевые клетки от здоровых тканей, что особенно актуально при терапии солидных опухолей.

При создании адаптерной молекулы и распознающей части химерного рецептора большинство модульных CAR использует известные белок-белковые (антитело-антиген, лейциновые молнии и проч.) или другие известные взаимодействия (например биотиновые системы) [220-222, 245-250] (**Рис. 2.11**). В качестве части адаптерной молекулы, распознающей опухолевый антиген используют хорошо охарактеризованные антитела [248, 251, 252]. Часть адаптерных CAR уже находится на стадии клинических испытаний (hmCD16CAR NCT05950334 ;UniCAR NCT04230265 ;PNE NCT04488354) [253] или применяются в виде испытаний в академических центрах [254]. Далее будут отдельно описаны наиболее известные системы регулируемых модульных CAR Т клеток.

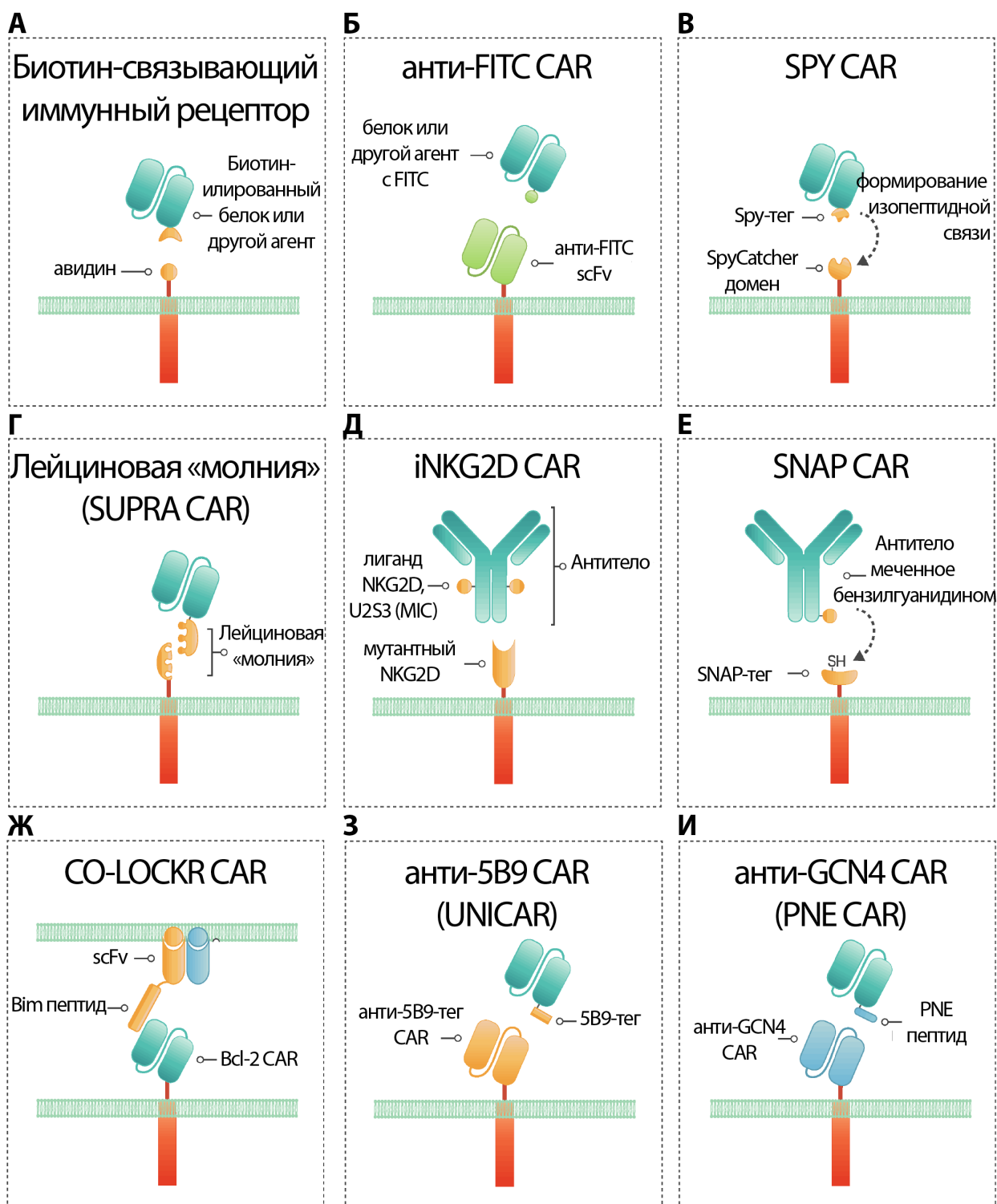


Рисунок 2.11. Схематическое изображение существующих модульных CAR. А. биотинсвязывающий CAR; Б. анти-FITC CAR; В. система SpyTag/SpyCatcher CAR; Г. лейциновая молния или SUPRA CAR; Д. CAR, содержащий мутантный NKG2D; Е. SNAP CAR; Ж. система CAR, зависящая от совместной локализации белка (Co-LOCKR); З. анти-5B9 CAR; И. CAR, специфичный к PNE пептиду. Адаптировано из [255].

2.6.1 Биотин-связывающий иммунный рецептор

Одним из первых модульных CAR был получен с применением биотина и авидина (Рис. 2.11 А). С одной стороны, добавление стрептавидина в распознающую часть CAR позволяет использовать коммерчески доступные биотинилированные антитела и другие

лиганды опухолевых антигенов. Такая доступность адаптерных молекул позволяет быстро тестировать различные способы направлять и контролировать активность модульных CAR T клеток в экспериментах *in vitro*. Также эффективность системы была подтверждена в экспериментах *in vivo* на мышинной модели рака яичников человека. Однако, стоит отметить что авторы данной статьи, видимо для достижения желаемого эффекта, вводили модульные CAR T клетки и адаптерные молекулы непосредственно в подкожные опухоли в высоких концентрациях [221]. С другой стороны существенным ограничением клинического применения данной системы является высокая иммуногенность авидина и стрептавидина [256].

2.6.2 Анти-FITC CAR

Аналогично биотин-связывающему иммунному рецептору, создание CAR специфичных к флуоресцеин-изотиоцианату позволяет использовать коммерчески доступные антитела, конъюгированные с FITC или другие лиганды опухолевых антигенов [220, 257] (**Рис. 2.11 Б**). Было показано, что анти-FITC CAR T клетки специфически распознают опухолевые клетки в присутствии антител и эффективны *in vitro* и *in vivo*. Эта система показала эффективность при таргетировании нескольких ТАА для более эффективной борьбы с гетерогенными популяциями рака. Интересно, что анти-EGFR антитело cetuximab, неэффективное против опухолевых клеток с мутацией *Kras*, показало высокую противоопухолевую активность в комбинации с анти-FITC CAR T клетками. Помимо антител в качестве адаптерных молекул были предложены $\alpha\beta 3$ интегрин [258] и фолиевая кислота [259-261], конъюгированные с FITC. Лу с соавторами¹⁸ показали возможность контролировать анти-FITC CAR T клетки после введения животным и предотвращать развитие CRS с помощью дозирования адаптера фолиевой кислоты, конъюгированной с FITC [260]. Однако, иммуногенность адаптеров на основе FITC ограничивает клиническое применение модульных анти-FITC CAR.

2.6.3 SPY CAR

Система на основе взаимодействия белков SpyTag/SpyCatcher использует N-концевой фрагмент белка (SpyCatcher) и C-концевой пептид из 13 аминокислот (SpyTag) фибронектин-связывающего белка из *Streptococcus pyogenes* [262]. Химерный рецептор SPY CAR содержит белок SpyCatcher в качестве внеклеточного домена, связанного с внутриклеточными сигнальными последовательностями [263] (**Рис. 2.11 В**). Адаптерные молекулы содержат Spy-тэг, который формирует изопептидную связь с SpyCatcher в составе CAR. Система SpyTag/SpyCatcher CAR показала свою эффективность при таргетировании опухолевых клеток экспрессирующих HER2, EGFR, EpCAM, CD20 и

hGPC3 [263] [264]. Из-за бактериального происхождения системы Tag/Catcher иммуногенность является проблемой, которая может препятствовать внедрению иммунных рецепторов SpyCatcher в клинику.

2.6.4 Лейциновая молния SUPRA CAR

Самые широкие возможности по оптимизации и конструированию модульных CAR были показаны для системы на основе лейциновой молнии SUPRA CAR [247]. Модульная система состоит из CAR, содержащий лейциновую молнию и панели адаптерных молекул с парой димеризации с лейциновой молнией различной аффинности (**Рис. 2.11 Г**). Было показано, что активность SUPRA CAR Т клеток можно ингибировать с помощью введения дополнительных молекул, конкурирующих за связывание с модульными CAR. Главным преимуществом данной системы является возможность изменять чувствительность CAR к адаптерным молекулам подбирая оптимальную аффинную пару лейциновой молнии не изменяя антиген-распознающую часть и настраивать чувствительность Т клеток, а также таргетировать опухоли с гетерогенной экспрессией антигенов.

2.6.5 iNKG2D CAR

Для преодоления проблем связанных с иммуногенностью лучше использовать эндогенные белки и их лиганды. Мутантная форма рецептора iNKG2D (активирующего рецептора на NK-клетках и некоторых миелоидных и Т-клетках) не взаимодействует с природными лигандами, но связывается с U2S3. Включение в состав CAR iNKG2D домена позволяет получить универсальный CAR, адаптером для которых выступают антитела конъюгированные с U2S3 (MIC) [250] (**Рис. 2.11 Д**). Для iNKG2D-CAR, в отличие от остальных модульных CAR, была показана возможность применения не только для онкологических заболеваний, но и для элиминации ВИЧ-инфицированных клеток с помощью анти-CD4 антител [265].

2.6.6 SNAP CAR

При создании модульных CAR также можно применять ферменты и их субстраты. Универсальный химерный рецептор SNAP CAR вместо антиген-распознающего домена содержит модифицированную О-6-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазу (SNAP-тег), фермент участвующий в репарации ДНК (**Рис. 2.11 Е**). Антитела, конъюгированные с бензилгуанидином, формируют ковалентную связь со SNAP-тег в составе CAR [266]. Основным преимуществом данного подхода, как и системы SpyTag/SpyCatcher, является образование ковалентной связи между CAR и адаптерной молекулой. Более того, в конструкции CAR не используется потенциально иммуногенных фрагментов.

2.6.7 CO-LOCKR CAR

Используя взаимодействие Vim-Bcl-2 Лахойе и др. [267] предложили “логический” модульный CAR (Co-LOCKR CAR) (**Рис. 2.11 Ж**). В данной системе Bcl-2 в составе CAR связывал адаптерный белок, содержащий Vim, только при определенной комбинации антигенов, что позволяет реализовать логические элементы И, ИЛИ и НЕ. В системе предлагается использовать два различных адаптерных белка. Первый адаптер содержит белок с анкириновыми повторами (DARPin) специфичных к HER2 и Vim домен. При связывании первого адаптера с HER2, Vim остается в закрытом состоянии и не доступен для взаимодействия с Bcl-2 в составе CAR. Второй адаптер специфичен к EGFR или EpCAM и содержит домен вытеснения Vim первого адаптера. В случае если оба адаптера взаимодействуют с двумя антигенами на поверхности опухолевой клетки конформационные изменения делают Vim доступным для взаимодействия с Bcl-2 в составе CAR. При инкубации с клетками, экспрессирующими HER2, EGFR и EpCAM в различных комбинациях авторы показали, что уничтожение клеток-мишеней Bcl-2 CAR Т клетками зависело от экспрессии обоих антигенов и концентрации адаптерных молекул. Однако, применимость данной стратегии на реальных пациентах кажется сомнительной. Все проведенные эксперименты были проведены с использованием модельных линий клеток с гиперэкспрессией опухолевых антигенов, особенно в таких комбинациях. Учитывая гетерогенность опухолей пациентов, маловероятно что удастся корректно подобрать эффективную дозировку каждого из адаптеров. Иммуногенность адаптеров также является потенциальной проблемой, как и в случае любой другой системы, включающей нечеловеческие белки.

2.6.8 Анти-5B9 CAR

Самой распространенной системой модульного CAR является платформа UniCAR [268]. Эффективность UniCAR была показана для многих опухоль-ассоциированных антигенов: CD33, CD98, CD123, FLT3, EGFR, STn, GD2, PSMA, и PSCA [268-274]. Адаптеры для UniCAR содержат неиммуногенный пептид из десяти аминокислот (5B9-тег), который был получен из нуклеарного аутоантигена La/SS-B (**Рис. 2.11 З**). В состав CAR входят переменные домены одноцепочечного антитела специфичного к La/SS-B. Важно отметить, что UniCAR является одним из немногих модульных CAR которые находятся на стадии клинических испытаний (NCT04230265) и уже применялся для терапии пациентов с ОМЛ в рамках академических клинических испытаний [254].

2.6.9 Анти-GCN4 CAR

Модульный анти-GCN4 CAR похож на UniCAR и использует адаптеры с пептидом. Анти-GCN4 CAR распознает неиммуногенный эпитоп дрожжевого фактора транскрипции GCN4 (PNE) в составе адаптерной молекулы (**Рис. 2.11 И**). Эффективность PNE CAR была показана для таких антигенов как CD19, CD20 и HER2 [222, 249]. В своей работе Роджерс с соавт. [222] показали, что, дозируя частоту введения и концентрацию адаптеров, можно контролировать активность, распределение в организме, выброс цитокинов, а также фенотип CAR T клеток *in vivo*.

2.7 Роль микроокружения опухоли при терапии CAR T клетками

Одним из основных факторов, влияющих на эффективность адоптивной иммунотерапии, является микроокружение опухоли (tumor microenvironment, TME), которое может препятствовать проникновению T клеток в сайт опухоли, менять метаболизм CAR T клеток, а также создает иммуносупрессивную среду, приводящую к их истощению. Внеклеточный матрикс и фибробласты создают физический барьер для проникновения и экспансии CAR T клеток [275, 276]. В результате aberrантной васкуляризации и активной пролиферации опухолевых клеток характерной особенностью солидных опухолей является недостаток кислорода и питательных веществ. Высокая гипоксия опухоли коррелирует с плохим прогнозом [277] для пациентов, эффективностью неoadъювантной терапии [278] и вероятностью появления метастаз [279]. Адаптация лимфоцитов к гипоксии и недостатку глюкозы приводит к изменению метаболических путей, которые замедляют пролиферацию CAR T клеток [280]. В экспериментах *in vitro* было показано, что гипоксия снижает динамику роста CAR T клеток в культуре, а также блокирует их дифференцировку в эффекторные клетки памяти [281]. Интересно, что CAR с разными сигнальными доменами CD28 или 4-1BB по-разному перестраивают свой метаболизм при гипоксии [14, 282, 283].

Основой иммуносупрессивного микроокружения опухоли являются инфильтрирующие иммунные клетки, такие как регуляторные T клетки (regulatory T cells, Treg), опухольассоциированные макрофаги (tumor-associated macrophages, TAM) или миелоидные супрессорные клетки (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) [284], которые способствуют созданию враждебной иммуносупрессивной среды, ограничивающей эффективность CAR T клеток [285].

Опухолевые клетки, лимфоциты инфильтрирующие опухоль (TILs) и экзосомы опухолевого происхождения часто экспрессируют лиганды ингибирующих рецепторов T

клеток, такие как CTLA-4/CD80, CD86 и PD-1/PD-L1, PD-L2, что приводит к подавлению противоопухолевого иммунитета [286-288].

Рецептор запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1) экспрессируется на поверхности активированных В-, Т- клеток и моноцитов [289]. Основная роль PD-1 заключается в предотвращении аутоиммунных реакций после продолжительной активации лимфоцита [289]. Однако, в случае опухолевых заболеваний, повышенная экспрессия лигандов PD-1 в сайте опухоли подавляет противоопухолевую активность Т- и CAR Т клеток [290]. Одним из способов противодействия ингибированию контрольными иммунными точками является нарушение взаимодействия PD-1 с его лигандами с помощью моноклональных антител. Антитела, нацеленные на CTLA-4 и PD-1 или PD-L1, были одобрены для клинического применения у пациентов с различными типами солидного рака [291].

Сочетанное применение CAR Т клеток и агентов, нарушающих взаимодействие ингибирующих рецепторов с их лигандами в опухоли, является крайне актуальным направлением адоптивной иммунотерапии [291]. Было показано, что CAR Т клетки, изолированные из опухолей, имеют повышенный уровень PD-1, причем часть этих клеток совместно экспрессирует TIM-3 и LAG-3 [292, 293]. Эффективность CAR Т клеток также негативно коррелирует с уровнем экспрессии в PD-L1 опухоли, при этом добавление антител, блокирующих взаимодействие PD1/PD-L1, значительно повышало эффективность CAR Т клеток [292, 294, 295].

Предварительные данные, полученные на небольших группах пациентов в ходе текущих клинических испытаний (NCT02414269, NCT01822652, NCT03980288, NCT03726515), показывают обнадеживающие результаты эффективности и безопасности комбинации CAR Т клеток с блокирующими антителами против PD-1/PD-L1 [296, 297]. Однако, важно учитывать возможные осложнения, связанные с экспрессией PD-1 и PD-L1 на кардиомиоцитах, которые приводили к летальным исходам [298-301].

Поэтому были предложены новые подходы для нарушения ингибиторного пути PD-1/PD-L1. В своей работе Рафиг и соавт. [302] создали CAR Т клетки, которые дополнительно экспрессируют scFv, специфичные к PD-1 или PD-L1. В экспериментах на животных эффективность таких CAR Т клеток оказалась сопоставимой с системным введением антител [303]. Также было предложено подавлять экспрессию PD-1 в CAR Т клетках с помощью миРНК [292]. Еще одной оригинальной идеей было создание химерных рецепторов, которые обращали ингибирующие сигналы от PD-L1/L2 в сигналы активации. Для этого были созданы рецепторы, внеклеточная часть которых включала PD-1, а внутриклеточные домены состояли из CD28 или 4-1BB [304]. Приведенные данные

подчеркивают важную роль баланса активирующих и ингибирующих сигналов в пролиферации и дифференцировке Т клеток.

С развитием технологии геномного редактирования клеток были проведены попытки создать Т клетки устойчивые к опухолевому микроокружению с помощью нокаута гена кодирующего PD-1. Однако, оказалось, что PD-1 играет важную роль в функционировании лимфоцитов и отсутствие PD-1 ускоряет истощение Т клеток, нарушает формирование клеток памяти и снижает долгосрочную противоопухолевую эффективность [305, 306]. На данный момент ведется ряд клинических испытаний, в которых изучается эффективность Т клеток с нокаутированным геном PD-1 для лечения солидных опухолей (NCT03747965, NCT03525782, NCT03706326, NCT03399448). Предварительные данные показали, что у некоторых пациентов снижался процент Т клеток, нокаутных по PD-1, в то время как немодифицированные клетки продолжали персистировать [307]. Для дальнейшего развития сочетанного применения ингибиторов иммунных точек и адоптивной иммунотерапии CAR Т клетками необходимо лучшее понимание процессов негативной регуляции Т клеток и факторов опухолевого микроокружения.

В последнее время все больше данных свидетельствует о патологической роли нейтрофилов в онкогенезе и метастазировании [308-310]. Высокое содержание нейтрофилов в опухоли ассоциировано с неблагоприятным прогнозом у раковых больных [311]. В первой фазе клинических испытаний CAR Т клеток, специфичных к СЕА, повышенное соотношение нейтрофилов к лимфоцитам коррелировало с плохими ответами на терапию у пациентов с метастатическим раком толстой кишки [312]. Нейтрофилы способны высвобождать внеклеточные ловушки NETs (neutrophil extracellular traps) которые состоят из большого количества геномной ДНК, связанных с ней белков и ферментов. Внеклеточные ловушки нейтрофилов были открыты как один из защитных механизмов действия нейтрофилов при бактериальных инфекциях. Выбрасываемые NETs задерживают распространение и убивают патогенных микробов в кровотоке [313, 314]. Позднее NETs были обнаружены и в биоптатах опухолей пациентов с различными видами рака. При этом их наличие коррелировало с неблагоприятным прогнозом у больных [315-317]. На животных моделях опухолевых заболеваний было показано, что в некоторых случаях ингибирование нетоза или разрушение NETs усиливает противоопухолевый ответ и предотвращает метастазирование опухоли [318].

Недавние исследования обнаружили, что еще одним важным фактором опухолевого микроокружения являются внеклеточные везикулы (extracellular vesicles, EV) (**Рис. 2.12**). Внеклеточные везикулы могут выступать в роли прогностического маркера опухолевых и других заболеваний [319]. Везикулы играют важную роль в обмене информации между

клетками и, за счет взаимодействия с иммунными клетками, могут повлиять на иммунный ответ [320, 321].

Стоит подчеркнуть, что опухолевые клетки выделяют значительно больше везикул, по сравнению с нормальными клетками окружающей ткани, что можно связать с ускоренной пролиферацией в условиях стресса [322-324]. Чрезвычайно важным этапом в «биографии» везикул стало обнаружение новой функции - переноса генетического материала (как правило, в форме различных типов РНК), который попадает в клетки-мишени, модулирует фенотип и функцию клеток на генетическом и эпигенетическом уровнях [320]. Многие факторы могут влиять на продукцию везикул клетками, так, например, известно, что условия низкого рН в опухолевом микроокружении важны для поддержания стабильности липидно-холестеринового состава везикул [325]. Однако эффект, который опухолевые внеклеточные везикулы оказывают *in vitro* и *in vivo* на CAR T клетки пока плохо изучен.

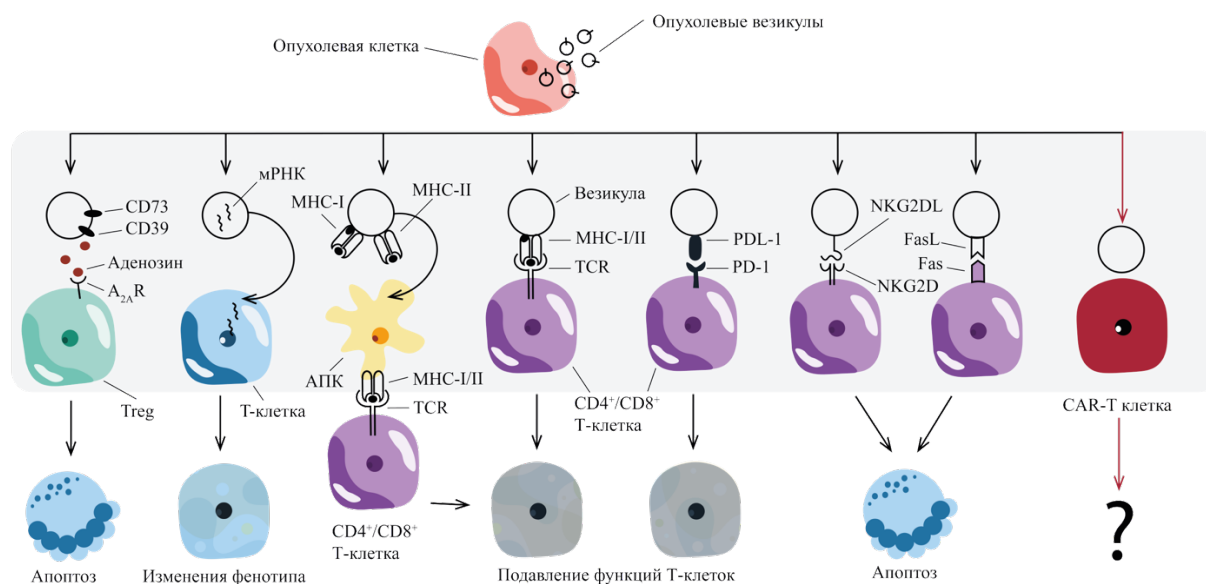


Рисунок 2.12. Влияние опухолевых везикул на различные популяции Т-лимфоцитов. На рисунке представлены эффекты, которые секретируемые опухолевые везикулы могут оказывать на Т клетки.

Таким образом, описанные подходы демонстрируют довольно широкий спектр возможностей конструирования CAR и изменения профиля их активности и персистенции в организме пациента. Вопросы, связанные с разработкой новых таргетированных CAR T клеток, исследования механизмов действия CAR в среде микроокружения опухоли, а также усилия, направленные на получение «регулируемых» с позиций фармакокинетики и фармакодинамики CAR T клеток, нашли отражение в данной диссертационной работе.

3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1 Химические реактивы и сопутствующие материалы.

Реактивы: трис-гидроксиметиламинометан (Трис); персульфат аммония; тетраборат натрия; этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); одно- и двузамещенный фосфат натрия; хлорид натрия; гидроксид натрия; соляная, фосфорная и уксусные кислоты; этиловый (70%, 96%) и изопропиловый спирт; полиэтиленгликоль (ПЭГ); бромистый этидий; β -меркаптоэтанол; глицин, Кумасси синий R-250; акриламид; N',N'-метиленабисакриламид; додецилсульфат натрия (ДСН); хлороформ; мочевиная; диметилсульфоксид (Helicon, Россия); агар; триптон; дрожжевой экстракт (Difco, Великобритания); трипановый синий 0,4% (Biorad, США); поли-L-лизин (Sigma, США); Pluronic F-127 (Sigma, США); уранил ацетат; BSA (Sigma, США); гематоксилин; маркеры размера фрагментов ДНК и молекулярной массы белков: GeneRuler™ 1k DNA Ladder (Fermentas, США), PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, США), PageRuler Plus Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific, США); набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep (Евроген, Россия); набор для проявления мембраны после вестерн-блоттинга ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham, США); субстрат люциферазы Luciferase Assay Reagent (Promega, США); концентрированные растворы дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (Thermo Scientific, США); T4 DNA Ligase Buffer (Thermo Scientific, США); клетки *E.coli* штамма DH5 α (Евроген, Россия); ДНК GeneRuler™ 1k DNA Ladder (Fermentas, США); RNeasy Midi Kit (Qiagen, Германия); кДНК Mint-2 (Евроген, Россия); Polybrene (Invitrogen, США); Dynabeads Untouched Human T Cells Isolation Kit (Invitrogen, США); рекомбинантный ИЛ-2 (Invitrogen, США); буфер для нанесения ДНК на агарозный гель (Евроген, Россия); набор для выделения ДНК из геля Набор Cleanup Standard (Евроген, Россия); PEI (Sigma, США); Q5 ДНК полимеразы (NEB, Великобритания); T4 DNA Ligase (Thermo Scientific, США); HiScribe™ Quick T7 High Yield RNA Synthesis Kit (NEB, Великобритания); AMPure XP (Beckman, США); Spy Cas9 NLS (NEB, Великобритания); P3 Primary Cell Solution Box (Lonza, Швейцария); BCA assay kit (Thermo Fisher, США); Total Exosome Isolation (from cell culture media) (Invitrogen, США); Цитохалазином В (Sigma, США); Nano-Glo Luciferase Assay (Promega, США); раствор для демаскировки антигена (Vector Laboratories, США); HMDS (REACHEM, Россия); Lenti-X p24 rapid titer assay (Clontech, США); раствор фиколла (ПанЭко, Россия); Exosome - Human CD81 Isolation Kit (from cell culture) (Invitrogen, США); коллагеназа D (Roche, Mannheim, Германия); Перколл (GE Healthcare, Питтсбург, Пенсильвания, США); концентрат 100 kDa Amicon (Millipore, США); Quanti-luc Gold (Invivogen, Франция); MACSPlex Exosome

Kit (Miltenyi Biotec, США); CAR T Expression Panel (NCounter, США); TRIzol reagent (Qiagen, Германия); CellTrace CFSE reagent (Invitrogen, США); D-люциферин (GoldBio, США); хроматографическая колонка Thermo Scientific™ Acclaim™ RepMap™ 100 C18 LC (Thermo Scientific, США); CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, США); лентивирусные частицы Nunclight red (Miltenyi Biotec, США); RIPA буфер (Thermo Scientific, США); Hoechst 33342 (Sigma, США).

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

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

Плазмидные вектора: Используемые плазмиды включают pLV2 от Clontech (США), GAG REV VSVG и pLV3 также от Clontech (США), а также pCDH115 — из коллекции Addgene (США). В дополнение применяются pCDH551B от Takara (Япония), pFUSE — от Invivogen (США), pCMV-VSV-G, также из Addgene (США), а также pRRE-GAG и pRSV-Rev, оба приобретены через Addgene (США).

Растворы: для приготовления растворов и буферов была использована вода особой чистоты из установки “Milli-Q” (Millipore, США).

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

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

PBST (10x): PBS + 1 мл Tween 20

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

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

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

LB-агар: LB, 18 г/л агара.

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

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

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

Пятикратный электродный буфер для электрофореза по Леммли: глицин 72 г/л, ДСН 5 г/л, Трис-HCl 6.5 г/л, pH 8.3.; Gel Loading Buffer II (Denaturing PAGE) (Invitrogen, США).

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

Разделяющий гель для электрофореза по Леммли: 12% смесь акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% ДСН, 0.375 М Трис–HCl, pH 8.9. N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин до концентрации 0.1%; NuPAGE™ Bis-Tris Midi Protein Gels, 10%, 1.0 mm, WedgeWell™ format (Invitrogen, США).

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

Среды для культивирования эукариотических клеток: FreeStyle (Invitrogen, США); Среда RPMI-1640 с глутамином (ПанЭко, Россия); RPMI Advanced (Gibco, США); DMEM Advanced (Gibco, США); 0,05% Trypsin-EDTA (Gibco, США); Fetal Bovine Serum (HyClone, США); Среда DMEM с глюкозой 4,5 г/л и глутамином (ПанЭко, Россия); Opti-MEM (Gibco, США); Fetal Bovine Serum (HyClone, США); Раствор DPBS (ПанЭко, Россия); PBS (ПанЭко, Россия); Glutamax (Gibco, США); раствора антибиотика/антимикотика (Gibco, США).

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

3.2 Работа с нуклеиновыми кислотами

3.2.1 Амплификация ДНК методом ПЦР

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали прибор Bio-Rad T100 Thermal Cycler (США). Для амплификации ДНК использовали Q5 ДНК полимеразу в соответствии с рекомендациями производителя Q5 High Fidelity DNA polymerase (NewEnglandBiolabs, США). Праймеры синтезировали в компаниях Евроген (Россия) или IDT (США). Количество праймеров в реакции составляло 10-20 пмоль каждого праймера, количество ДНК не более 5 нг. Для определения температуры отжига праймеров использовали программное обеспечение SnapGene (США).

3.2.2 Рестрикция плазмидной ДНК и ПЦР продуктов

Для рестрикции ДНК и ПЦР продуктов были использованы эндонуклеазы рестрикции компании СибЭнзим (Россия), ThermoFisher Scientific (США) и NewEnglandBiolabs (США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для проведения рестрикции использовали 1 мкг плазмидной ДНК или 3 мкг ПЦР продукта, инкубацию ДНК с эндонуклеазами рестрикции проводили при 37°C (при 50°C для SfiI) не менее одного часа (в зависимости от количества сайтов рестрикции, активности фермента и концентрации ДНК). Короткие молекулы ДНК или ПЦР продукты обрабатывали ферментами в течение 3 часов. Для очистки продуктов рестрикции реакцию смесь разделяли в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия или SYBR green (ThermoFisher, США). После разделения в 1% агарозном геле, фрагменты ДНК требуемого размера визуализировали с помощью трансиллюминатора, вырезали из геля и выделяли с помощью набора Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (NewEnglandBiolabs, США). Концентрацию ДНК определяли с помощью спектрофотометра системы NanoDrop (ThermoFisher Scientific США).

3.2.3 Молекулярное клонирование

Для интеграции фрагментов ДНК в плазмидные вектора использовали набор для бесшовной сборки и клонирования ДНК-конструкций NEBuilder® HiFi Assemble Master Mix (NewEnglandBiolabs, США). Плазмидный вектор и ДНК для интеграции смешивали в молярном соотношении 1:2 в объеме 10 мкл, добавляли к 10 мкл HiFi Assemble Master Mix и инкубировали 20 минут при 50°C. Для трансформации компетентных клеток использовали до 2 мкл реакционной смеси. Для сайт специфического клонирования “острое клонирование” использовали T4 ДНК лигазу согласно рекомендации производителя. Фрагменты ДНК смешивали в соотношении вектора и вставки 1:5-1:10 в зависимости от размера вставки и вектора. Реакцию лигирования проводили при комнатной температуре не менее 1 часа. Для трансформации компетентных клеток использовали до 2 мкл реакционной смеси. При производстве библиотек циклопептидов или

3.2.4 Трансформация клеток *E.coli* методом теплового шока

Компетентные клетки *E.coli* штамма DH5α (Евроген, Россия) или XL-1 Blue (ThermoFisher Scientific, США) размораживали на льду. Перед проведением трансформации компетентные клетки размораживали на льду. К клеткам добавляли 2 мкл лигазной смеси, перемешивали и инкубировали на льду не менее 30 минут. Затем клетки трансформировали при температуре 42°C не более 90 секунд и возвращали в лед на 5 минут. Далее к клеткам добавляли 500 мкл среды SOC без антибиотика и инкубировали 40 минут при 37°C. После чего трансформированные клетки высевали на чашку Петри со средой LB-агар и

селективным антибиотиком, размазывали стерильным шпателем, высушивали, переворачивали и ставили в термостат на 37°C на ночь. Эффективность трансформации оценивали количеством выросших индивидуальных колоний в пересчет на 1 мкл лигазной смеси.

3.2.5 Выделение плазмидной ДНК

Выросшие на чашке Петри колонии бактерий с помощью стерильной петли переносили в пробирки с 15 мл среды LB с добавлением селективного антибиотика. Далее, для наработки плазмидной ДНК клетки растили при 37°C и интенсивном перемешивании.

Через 20 часов с посева в культуральную среду, клетки осаждали центрифугированием и проводили выделение плазмидной ДНК с помощью набора набора для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) или QIAprep Miniprep Kit (Qiagen, США). Для наработки плазмидных векторов, используемых при наработке лентивирусных частиц, требуются большие количества ДНК и требования к чистоте ДНК гораздо выше. Недостаточная очистка плазмидных векторов может привести к гибели трансформируемых клеток и низкому выходу лентивирусных частиц после трансфекции. Для очистки плазмидных векторов, используемых в производстве лентивирусных частиц, к 250 мл среды LB добавляли бактериальные клетки модифицированные плазмидной ДНК. Через 20 часов инкубации при 37°C с хорошей аэрацией клетки собирали центрифугированием. Для выделения плазмидной ДНК были использованы наборы NucleoBond Xtra Plasmid Kit (Takara Bio, Япония) с обязательной дополнительной стадией промывки мембран и осаждением ДНК раствором изопропанола. Концентрацию и чистоту ДНК определяли с помощью спектрофотометра системы NanoDrop (ThermoFisher Scientific, США) и электрофореза ДНК в агарозном геле.

3.2.6 Электрофорез ДНК в агарозном геле

Для проведения электрофореза ДНК, агарозу высокой чистоты с низким ЕЕО, не содержащая ДНКаз, РНКаз и протеаз (GoldBio, США) растворяли в буфере электрофореза TBE и нагревали до кипячения. После полного растворения агарозы, 1% агарозный гель остужали до температуры 70°C, добавляли бромистый этидий в концентрации 0.5 мкг/мл и выливали в форму для формирования агарозного геля. Пробы с ДНК смешивали с 6X буфером нанесения (NewEnglandBiolabs, США) и добавляли в лунки геля. Для определения размера ДНК был использован маркер размера фрагментов ДНК 1k DNA Ladder (ThermoFisherScientific, США). Разделение ДНК проводили в буфере TBE в камере для гель-электрофореза (ThermoFisher Scientific, США) при силе тока в 80мА в начале электрофореза и 100 мА через 10 минут.

3.2.7 *Получение последовательностей кДНК генов белков из эукариотических клеток*

Источником мРНК кодирующих опухоль ассоциированные антигены были опухолевые линии клеток с подтверждённой экспрессией антигена. Для выделения мРНК был использован набор RNeasy Midi Kit (Qiagen, Германия). Далее, выделенная мРНК была использована в качестве матрицы для проведения реакции обратной транскрипции с помощью набора для синтеза кДНК Mint-2 (Евроген, Россия) или M-MuLV Reverse Transcriptase (NewEnglandBiolabs, США). С помощью реакции обратной транскрипции были получены гены, кодирующие BCR опухолевых клонов пациентов с диагнозом фолликулярная лимфома, а также CD19, CD22, CD33, CD123, IL13r2a, HER2, PD-L1 и проч. Далее кДНК была амплифицирована методом ПЦР, интегрирована в состав лентивирусных векторов pLV2, pLV3 или pCDH и использована для трансдукции клеток.

3.2.8 *Создание генетических конструкций*

Гены кодирующие химерные антигенные рецепторы или их отдельные фрагменты были синтезированы в компаниях GeneCust (Франция) или IDT (США). Также были синтезированы гены кодирующие: внутриклеточный блокатор на основе анти-PD1 нанотела 102с3 (VHH) (любезно предоставлена Чумаковым С.П.), миоферлин, CD63 и его варианты, tEGFR, PSMA, TrkB, рецептор фолиевой кислоты и др.

Работы связанные с созданием регулируемых CAR T клеток на основе взаимодействия барназы с барстаром, а также клонирование адаптерных белков на основе барназы, были проведены совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН под руководством академика Сергея Михайловича Деева.

Описанные ранее аминокислотные последовательности EC1 [326] и G3 (PDB: 2JAB) [327] были использованы для получения нуклеотидных последовательностей кодирующих дарпин. Для продукции адаптерных молекул был использован плазмидный вектор pET39b, в котором экспрессия барстара контролируется естественным промотором [328]. В данный плазмидный вектор были клонированы дарпины 9.29, EC1 и G3 в формате дарпин-барназа-гис тэг [329].

Для создания библиотеки циклопептидов в составе CAR и проведения аутокринной селекции сначала была получена генетическая pLV2 ssIL2.MCS.IgG1Fc.28.OX40.z конструкция, кодирующая CAR третьего поколения под контролем промотора фактора элонгации 1a (EF1a). Последовательность химерного антигенного рецептора включала сигнальный пептид интерлейкина-2, сайт для клонирования циклопептидов библиотеки MCS, шарнирный домен IgG1 Fc, серин-глициновый линкер, трансмембранный домен CD28, сигнальные домены CD28 и OX-40 и домен активации CD3ζ. Для создания комбинаторной библиотеки семичленных циклопептидов в составе CAR были

синтезированы олигонуклеотиды с вырожденными кодонами NNK (CX₇C (X = 20 природных аминокислот)), которые были фланкированы кодонами цистеинов. Данные праймеры были использованы для амплификации циклопептидов слитных с последовательностью CAR методом перекрывающегося ПЦР. А затем клонированы в лентивирусный вектор pLV2 по сайтам рестрикции EcoRI и NheI. Представительность библиотеки циклопептидов в составе CAR составила более 10⁹ вариантов.

Для внутриклеточной экспрессии люциферазы в клетках для проведения прижизненной визуализации опухоли были использованы лентивирусные частицы, полученные с помощью плазмидного вектора pCDH FLuc_Hygro (под контролем CMV промотора находится люцифераза светлячка, а ген устойчивости к гигромицину под контролем EF1a). Данный плазмидный вектор был любезно предоставлен профессором Хонгкаем Жангом из лаборатории Ричарда Лернера Scripps Research (Сан-Диего, США).

3.3 Работа с белками

3.3.1 Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле

Для проведения электрофоретического разделения белков использовали готовые гели Bolt Bis-Tris Plus Gels или NuPAGE Tris-Acetate производства ThermoFisherScientific (США). Образцы смешивали с буфером нанесения, инкубировали при 95°C и наносили в лунки разделения. Для определения размера белков, вместе с образцами наносили маркер молекулярной массы белков PageRuler Plus Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific, США). Для проведения электрофореза использовали систему Mini Gel Tank (ThermoFisherScientific, США) согласно инструкции производителя. Для визуализации белков электрофореза разделяющий гель окрашивали Кумасси синим R-250.

3.3.2 Вестерн-блот анализ

При анализе клеток и выделенных экзосом образцы предварительно лизировали в RIPA Lysis and Extraction Reagent (ThermoFisherScientific, США). Далее, образцы смешивали с денатурирующим и восстанавливающим буфером нанесения, инкубировали при 95°C, наносили в лунки разделения и проводили гель-электрофорез. После разделения белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Power Blotter Select Transfer Stacks, nitrocellulose, mini (ThermoFisherScientific, США) с помощью системы переноса iBlot 2 (ThermoFisherScientific, США). Эффективность переноса определяли окрашиванием белков на мембране раствором Понсо S. Для предотвращения неспецифического окрашивания мембрану блокировали 1 час 5% раствором обезжиренного молока в PBS с добавлением 0.05% Tween-20 (PBST). Затем мембрану отмывали в буфере PBST и проводили гибридизацию с первичными и вторичными антителами. Для визуализации антител

использовали субстрат ECL Plus (Pierce, США). Сигналы хемилюминесценции детектировали на приборе гель-документации VersaDoc (BioRad, США).

3.3.3 *Продукция дарпин-барназы*

Для наработки и очистки молекулярных адаптеров на основе дарпин-барназы были использованы клетки *E. coli* штамма BL21(DE3). После трансформации плазмидными векторами pET39b клетки культивировали в среде ZYM-5052 с добавлением канамицина (50 мг/л). Для корректного фолдинга и предотвращения формирования телец включения клетки культивировали при температуре +25°C. Для выделения рекомбинантных белков, клетки центрифугировали и лизировали с помощью добавления 30 мкг/мл лизоцима. Для предотвращения деградации белков был использован буфер 100 mM Tris-HCl, 250 mM сахарозы, 0,5 mM ЭДТА, pH 8,0 с добавлением ингибитора сериновых протеаз 0,5 mM PMSF. После обработки лизоцимом (30-50 минут), клетки разрушали с помощью ультразвука на льду. Полученную суспензию центрифугировали 10 минут при 10000 g и фильтровали полученный супернатант. Для выделения белков использовали металл-хелатную аффинную хроматографию на колонках HisTrap HP (Cytiva, США). Для предотвращения гибели клеток из-за РНКазной активности барназы вместе с адаптерными молекулами клетки продуцировали барстар. Для отделения связавшегося барстара колонки промывали 6 M гидрохлорида гуанидина с постепенно снижающейся концентрацией. Для элюции белков использовали 250 mM имидазола.

3.3.4 *Конъюгация белков с FITC*

Для получения белков, конъюгированных с флуоресцентными метками, были использованы наборы Pierce Antibody Labeling kit (ThermoFisherScientific, США). После мечения белков, реакционную смесь очищали с FITC с помощью колонок Zeba Spin Desalting Columns, MWCO 7k (ThermoFisherScientific, США). Эффективность конъюгирования оценивали спектрофотометрически на приборе NanoDrop.

3.3.5 *Поверхностный плазмонный резонанс*

Для измерения параметров взаимодействия белков и их лигандов, включая низкомолекулярные соединения, использовали систему Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences, США). Изучение взаимодействия PSMA и HER2 с соединениями, отобранными из библиотеки ДНК кодируемых химических соединений DEL проводили в центре коллективного пользования Scripps Research (США). Для проведения измерений были использованы рекомбинантные PSMA и HER2 конъюгированные с биотином (AcroBiosystems, США). Соединения DEL были предоставлены компанией WuXi Aptech (Китай). Измерения параметров взаимодействия В клеточных рецепторов с отобранными

циклопептидами были произведены в Санкт-Петербургском национальном исследовательском Академическом университете РАН. Циклопептиды были синтезированы (GeneCust, США) и иммобилизованы на чипах SA. Далее в реакционную камеру к циклопептидам добавляли рекомбинантные антитела в различных концентрациях, на скорости 25 мкл/мин. Для расчёта параметров взаимодействия использовали программное обеспечение Biacore.

3.4 Работа с культурами эукариотических клеток

3.4.1 *Поддержание в культуре адгезионных эукариотических клеток*

Адгезионные клетки культивировались стандартными методами. Основной средой была Advanced DMEM (Gibco, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки FBS (Gibco, США) и 100 U/мл пенициллина-стрептомицина (Gibco, США). При проведении экспериментов цитотоксичности CovCAR T клеток в отношении клеток KB была использована среда без фолиевой кислоты DMEM (Gibco, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки FBS (Gibco, США) и 100 U/мл пенициллина-стрептомицина (Gibco, США). Клетки рассевали при достижении конfluence 90%. Для этого клетки последовательно промывали стерильным PBS и 0,05% Trypsin-EDTA (Gibco, США). Через 5 минут клетки откреплялись, разбавляли в свежей культуральной среде и рассевались.

3.4.2 *Поддержание в культуре суспензионных эукариотических клеток*

Суспензионные клетки культивировались стандартными методами. Основной средой была Advanced RPMI (Gibco, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки FBS (Gibco, США) и 100 U/мл пенициллина-стрептомицина (Gibco, США). Клетки рассевали и культивировали согласно рекомендациям, размещенным на сайте американской коллекции типовых культур ATCC (<https://www.atcc.org/>).

3.4.3 *Трансфекция для получения лентивирусных частиц*

Для наработки лентивирусных частиц за день до проведения трансфекции клетки линии НЕК293Т рассевали в культуральные флаконы T75 (Corning, США) в концентрации 0,4–0,5 млн./мл. На следующий день, когда конfluence клеток составляла не более 80% проводили трансфекцию клеток, наилучшие результаты трансфекции получались при использовании реагента Lipofectamine 2000 (ThermoFisherScientific, США). Лентивирусный вектор 10 мкг смешивали с 10 мкг GAG, 5 мкг REV и 2 мкг VSV-G пакирующих плазмид в 1,5 мл OPTI-MEM (Gibco, США). В отдельной пробирке смешивали 75 мкл Lipofectamine 2000 и 1,5 мл OPTI-MEM. Через 5 минут плазмидные вектора и трансфекцирующий агент смешивали и инкубировали 20 минут при комнатной температуре. Далее из флакона отбирали культуральную среду, к смеси ДНК/Lipofectamine 2000 добавляли 10 мл среды

для адгезионных клеток и медленно наслаивали на монослой клеток. Клеточный супернатант с лентивирусными частицами собирали через 48-72 часа после трансфекции, центрифугировали при 250 g чтобы удалить остатки клеток и собирали супернатант. Для концентрации лентивирусных частиц использовали Lenti-X concentrator (Takara, Япония). Титр лентивирусных частиц определяли с помощью ИФА набора Lenti-X p24 rapid titer assay (Clontech, США).

3.4.4 Создание аденоассоциированных вирусных частиц

Нуклеотидная последовательность, кодирующая гиперактивный вариант ДНКазы I человека, была синтезирована и клонирована в плазмидный вектор pAAV-ApoEHCR. Полученный плазмидный вектор pAAV-ApoEHCR-ash.DNaseI был использован для наработки аденоассоциированных вирусов. Нарботка ААВ частиц производилась в лаборатории Алллана Тсунга в Университете Штата Огайо (Огайо, США). Для наработки вирусных частиц за день до проведения трансфекции клетки линии HEK293T рассевали в концентрации 0,4–0,5 млн./мл и, на следующий день, трансфицировали плазмидами гер/сар, кодирующую капсид Anc80L65, и pAAV-ApoEHCR-ash.DNaseI с помощью реагента PEI-MAX (Invitrogen, США). Аденоассоциированные вирусы очищали в градиенте йодиксанола и стабилизировали с помощью 0,001% Pluronic F68 (Gibco, США). По результатам ПЦР анализа, средний титр вирусных частиц составлял $1,0 \times 10^{13}$ копий генома/мл.

3.4.5 Выделение Т клеток

Для выделения Т клеток из периферической крови здоровых доноров использовали пробирки обработанные ЭДТА или гепарином. Для увеличения эффективности разделения эритроцитов и мононуклеарных клеток, кровь разбавляли физиологическим раствором (без солей магния и кальция) в 4 раза. Далее, в стерильные пробирки объемом 50 мл наливали 15 мл раствора фикола Ficoll-Paque PLUS (Cytiva, США) и после этого аккуратно наслаивали разбавленную кровь. Далее пробирки центрифугировали 45 мин при 650g и отбирали фракцию мононуклеарных клеток, сконцентрированных на границе плотности растворов. Клетки отмывали PBS и выделяли популяцию Т клеток с помощью набора EasySep™ Human T Cell Isolation Kit (Stemcell, США). При проведении лентивирусной трансдукции к Т клеткам добавляли магнитные частицы несущие антитела к CD3 и CD28 Dynabeads™ Human T-Activator (ThermoFisherScientific, США) в соотношении 2 к 1, а также рекомбинантный ИЛ-2 в концентрации 100ед./мл (Merck Millipore, ФРГ).

3.4.6 Получение CAR Т клеток

После выделения, Т клетки культивировались в полной среде для суспензионных клеток с добавлением ИЛ-2 в концентрации 100ед./мл. Для получения CAR Т клеток,

активированные магнитными частицами Т клетки инкубировали 48 часов. Затем, клетки, вместе с магнитными частицами, отмывали и ресуспендировали в концентрации $0,5 \times 10^6$ /мл. Для увеличения эффективности трансдукции использовали Полибрен (Millipore, США) в концентрации 1 мкг/мл. Самые оптимальные результаты трансдукции получались при использовании 6-луночных планшетов. В лунку 6-луночного планшета добавляли 2 мл активированных Т клеток в концентрации $0,5 \times 10^6$ /мл. К клеткам добавляли концентрированные лентивирусы или супернатант после наработки лентивирусных частиц и центрифугировали в течение 90 минут при 1200g и температуре 32°C (спинфекция). На следующий день культуральную среду меняли на свежую и через 48-72 часа после трансдукции убирали CD3/CD28 частицы с помощью магнитной сепарации. Далее CAR Т клетки рассеивали при достижении концентрации не более 2 млн./мл. Эффективность трансдукции определяли методами проточной цитофлуориметрии.

3.4.7 Трансдукция клеточных линий

Трансдукция клеточных линий происходит с большей эффективностью чем трансдукция Т клеток CAR. Поэтому метод спинфекции (90 минут при 1200g и температуре 32°C) и концентрированные лентивирусы применяли в случаях низкой экспрессии белка или труднотрансфецируемых клеток. В остальных случаях к клеткам в концентрации 1 млн./мл или конфлюентности не более 80% добавляли лентивирусный супернатант. Для увеличения эффективности трансдукции использовали Полибрен (Millipore, США) в концентрации 1 мкг/мл. На следующий день у клеток меняли культуральную среду на свежую. Эффективность трансдукции определяли методами конфокальной микроскопии или проточной цитофлуориметрии.

3.4.8 Нокаут генов клеток

Нокаут гена CD19, PTPRC и др. в клетках был произведен с помощью эндонуклеазы из набора Spy Cas9 NLS (NewEnglandBiolabs, США). Для нарушения целостности генов с помощью алгоритма Crispor (Tefor Infrastructure, Франция) подбирались последовательности гайдовых нуклеотидов (гайдовых РНК, gRNA). Для производства gRNA были использованы синтезированные праймеры, которые очищали с помощью набора AMPure XP (Beckman, США), и набор HiScribe™ Quick T7 High Yield RNA Synthesis Kit (NewEnglandBiolabs, США). Для получения комплексов gRNA с Spy Cas9 NLS, смешивали 2 мкг полученной gRNA и 3,3 мкг эндонуклеазы, затем инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Для проведения нокаута гена CD19 в клетках Nalm-6 на приборе 4D Nucleofector (Lonza, Швейцария) была использована программа EH100 и набор P3 Primary Cell Solution Box (Lonza, Швейцария). Эффективность нокаута генов целевых

белков оценивали проточной цитофлуориметрии. Для получения негативной популяции клетки сортировали методом FACS с помощью прибора SH800 Cell Sorter (Sony, Япония).

3.4.9 Экспрессия рекомбинатных белков

Для наработки рекомбинатных белков, включая антитела, была использована система FreeStyle 293-F (ThermoFisherScientific, США). Клетки культивировали при постоянном перемешивании в колбах Эрленмейера (Corning, США) при температуре 37°C, концентрации CO₂ и высокой влажности. Оптимальными условиями трансфекции являются концентрация клеток 1 млн./мл в объёме 100-200 мл среды FreeStyle. Количество плазмидной ДНК рассчитывали из соотношения 1 мкг ДНК на 1 млн. клеток. Трансфекцию клеток производили с помощью трансфицирующего агента 293fectin (Thermo Fisher Scientific, США) согласно рекомендациям производителя. Через пять дней после трансфекции, клетки центрифугировали, отобранный супернатант фильтровали и использовали для выделения белков методами аффинной хроматографии.

3.5 Получение и характеристика экзосом и везикул

3.5.1 Выделение экзосом

В работе использовались два метода выделения экзосом – с помощью ультрацентрифугирования и осаждением ПЕГ. Для получения экзосом клетки в концентрации более 1 млн./мл и инкубировали в клеточной среде несколько дней, в зависимости от возможности клеток переносить подобные условия. Далее клетки центрифугировали 10 мин. при 300g, отбирали супернатант и повторно центрифугировали 20 минут при 2000g, и затем еще раз 30 мин. при 120000g. Полученный супернатант использовали для выделения экзосом ультрацентрифугированием 90 мин. при 100000g или смешивали с раствором ПЕГ Total Exosome Isolation (from cell culture media) (Invitrogen, США) и последующим центрифугированием. Осадок, содержащий экзосомы, растворяли в PBS. Для характеристики размера экзосом методом NTA был использован прибор NanoSight LM10-HS (Malvern Panalytical Ltd, Великобритания). Для анализа полученных изображений было использовано программное обеспечение NTA 2.3 build 33 (Malvern Panalytical Ltd, Великобритания).

3.5.2 Получение искусственных антигенных везикул

Для получения искусственных везикул (artificial vesicles, AV) были использованы клетки линии HeLa, которые экспрессировали трансмембранно-заякоренный флуоресцентный белок tdTomato и опухолевый антиген. Для формирования AV клетки (1 млн./мл) открепляли от культурального пластика трипсином и добавляли цитохалазин В в концентрации 10 мкг/мл. Наиболее оптимальным буфером для получения искусственных

везикул является DMEM с добавлением 10% FBS и 1% Pluronic F-127. Через 10 минут после добавления цитохалазина В, клетки интенсивно встряхивали. В результате встряхивания от клеток отделялись искусственные везикулы. Для отделения дебриса клеток полученную суспензию центрифугировали 5 мин. при 100g. Полученный супернатант центрифугировали 20 мин. при 3000g, осадок содержал искусственные везикулы.

3.5.3 Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)

Анализ формы и размера выделенных экзосом и искусственных везикул был проведен на кафедре биоинженерии МГУ им. Ломоносова совместно с Багровым Д.В. Образцы наносили на сетки обработанные углеродной пленкой, инкубировали в 1% растворе уранил ацетата, высушивали и использовали для получения изображений на электронном микроскопе EM-1400 (Jeol, Япония) 100 kV.

3.5.4 Детекция хемилюминесценции CD63-nanoluc экзосом

Для проведения реакции окисления субстрата использовали набор для детекции хемилюминесценции Nano-Glo Luciferase Assay (Promega, США), содержащий субстрат для фермента нанолуциферазы. Исходный супернатант, супернатант после ультрацентрифугирования и полученную суспензию EV CD63-nanoluc смешивали в соотношении 1:1 с субстратом Nano-Glo и анализировали на приборе VarioScan (Thermo Fisher, США). Все измерения проводили не менее чем в 5-ти повторностях с соответствующими отрицательными контролями для определения фоновых значений сигнала.

3.5.5 Конфокальная микроскопия искусственных везикул и CAR T клеток

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

3.5.6 Сканирующая электронная микроскопия искусственных везикул и CAR T клеток

Для получения дополнительной информации о взаимодействии CAR Т клеток и AV была проведена сканирующая электронная микроскопия. После воздействия AV (протокол был

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

3.5.7 Анализ искусственных везикул методом жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии

Анализ образцов искусственных везикул проводили методом LC-MS был проведен группой масс-спектрометрии центра коллективного пользования "Биоорганика" ИБХ РАН. Образцы AV наносили на колонку Acclaim PepMap 100 C18 (100 мкм x 2 см) в подвижной фазе (2% ацетонитрил (ACN), 98% H₂O, 0,1% TFA) при скорости 10 мкл/мин и разделяли при 40°C на колонке Thermo Scientific TM Acclaim™ PepMap™ 100 C18 LC с внутренним диаметром 75 мкм с размером частиц 3 мкм. Обратнo-фазовую хроматографию выполняли с помощью системы Ultimate 3000 Nano LC (Thermo Fisher Scientific, США), которая была подключена к масс-спектрометру Orbitrap Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific, США) через источник наноэлектроспрея (Thermo Fisher Scientific, США). Воду, содержащую 0,1% (об./Об.) муравьиной кислоты (FA), использовали в качестве подвижной фазы А, а ACN, содержащую 0,1% (об./Об.), 20% (об./Об.) H₂O, в качестве подвижной фазы В. Элюцию пептидов проводили линейным градиентом: 5–28% В в течение 56 мин; 28–45% В в течение 6 минут, 45–99% В в течение 1 минуты, 99% В в течение 5 минут, 99–5% В в течение 1 минуты при скорости потока 300 нл/мин. После каждой ступени градиента колонку повторно уравнивали буфером А в течение 10 мин. Данные MS были собраны в режиме DDA (TopN = 15). Параметры MS1 были следующими: разрешение 120K, диапазон сканирования 350–1400, максимальное время инъекции - 50 мсек, цель АРУ - 3х10⁶. Ионы выделяли с окном 1,2 m/z, предпочтительным соответствием пептидов и исключением изотопов. Динамическое исключение было установлено на 30с. Фрагментация MS2 проводилась с разрешением 15K при энергии столкновения HCD 28, максимальное время инъекции - 80 мс, цель AGC - 1х10⁵. Другие настройки: исключение заряда - не назначено,

1,> 7. Необработанные спектры обрабатывали с использованием программ MaxQuant 1.6.17.0 (MQ) и Perseus 1.6.15.0. Поиск данных проводился в базе данных Homo sapiens Swissprot, загруженной с UniprotKB, содержащей канонические и изоформные белки, версия от 07.2021. Поиск MaxQuant был выполнен с набором параметров по умолчанию, включая специфичность трипсин/р протеазы, максимум 2 пропущенных расщепления, окисление Met, N-членное ацетилирование белка и дезамидирование NQ в качестве переменных модификаций и карбамидометил-Cys в качестве фиксированной модификации, максимум 5 модификаций на пептид, 1% ПСМ и белок FDR. Были включены следующие опции: второй пептид, совпадение между сериями. Все прогоны были проанализированы как независимые эксперименты и обработаны в Perseus. В Perseus результаты группы белков были отфильтрованы на загрязняющие вещества, обратные и «идентифицированные только по сайту» белки. Алгоритм iBAQ, реализованный в программе MaxQuant (2), использовался для количественной оценки белков в образце яда. Для получения относительного значения iBAQ (riBAQ), представляющего мольную долю каждого белка, была проведена нормализация значения iBAQ каждого белка относительно суммы всех значений iBAQ.

3.6 Функциональные эксперименты

3.6.1 Проточная цитофлуориметрия

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

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

Окрашивание искусственных везикул AV: Для количественного и качественного анализа антигенных везикул был использован метод проточной цитофлуориметрии. К свежевыделенным AV добавляли различные антитела для характеристики поверхностных маркеров и инкубировали в течение 30 мин при 4°C, трижды промывали 500 мкл VB

(DMEM, 10% FBS, 1% Pluronic F-127) на скорости 5000g 10 мин, и далее анализировали методом проточной цитофлуориметрии на приборе NovoCyte 2060 (ACEA Biosciences, США).

Окрашивание клеток с dTomato-AV: CAR T или донорские T клетки ресуспендировали в VB в концентрации $0,5 \times 10^6$ / мл. Клетки инкубировали с 20 мкг (~ 5 AV на 1 T-клетку) свежeweделенных AV в течение 30 мин при 4°C, трижды промывали 500 мкл VB, а затем анализировали проточной цитометрией на приборе NovoCyte 2060 (ACEA Biosciences, США).

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

3.6.2 Инкубация CAR T клеток в присутствии экзосом (EV)

Для анализа тропности экзосом опухолевых клеток EV по отношению к CAR T-клеткам, супернатанты репортерных линии клеток U87/CD63-nanoluc и Nalm-6/CD63-nanoluc были добавлены к CAR19 и IL13-CAR T-лимфоцитам. Супернатанты клеток U87/CD63-nanoluc и Nalm-6/CD63-nanoluc концентрировали на мембране 100 kDa Amicon (Millipore, США). Концентрацию экзосом оценивали при помощи BCA assay kit (Thermo Fisher, США). Далее, экзосомы в различных концентрациях добавляли к $0,2 \times 10^6$ Jurkat CAR19 и Jurkat IL13-CAR клеткам и инкубировали при 37°C в течение 10 мин. Затем клетки осаждали, промывали и детектировали хемилюминесценцию, с помощью метода, описанного ранее. Аналогичный эксперимент был проведен с экзосомами, очищенными методом УЦ (ультрацентрифугирование).

3.6.3 Анализ эффекторной активности CAR T-клеток

Анализ цитотоксичности CAR T-клеток под действием EV: Для анализа высвобождения ЛДГ CAR19-T-клетки предварительно инкубировали в присутствии CD19⁺ или CD19⁻ EV,

выделенных из клеток Nalm-6 или клеток Nalm-6 с нокаутированным геном CD19 (на 1 CAR T-клетку приходилось 25×10^3 EV). CAR T-клетки обрабатывали экзосомами в течение 48 ч при 37°C и 5% CO₂. Далее CAR T-клетки смешивали с 5×10^3 клеток Jeko-1 (NucLight Red) в соотношениях Е:Т (5:1, 2.5:1, 1:1 и 1:2) и ко-инкубировали 12 часов при 37°C и 5% CO₂ в полной среде RPMI 1640 с добавлением человеческого ИЛ-2 (30 Ед/мл). Кроме экспериментальных лунок, были поставлены контроли, рекомендованные инструкцией к набору. После инкубации к контрольным лункам (таргетные клетки без CAR Т-клеток) добавляли лизирующий буфер и инкубировали в течение 40 мин для достижения полного лизиса клеток. Анализ цитотоксичности проводили согласно протоколу изготовителя с помощью прибора VarioScan (США).

Анализ цитотоксичности CAR Т клеток под действием AV: Для оценки влияния AV на цитотоксичность CAR Т-клеток, 5×10^6 CAR19 Т клеток инкубировали с CD19-AV либо peg-AV при соотношении Т-клетка/AV 10: 1 или 5:1 в течение 4 дней. Для оценки базального уровня цитотоксичности CAR19 Т-клетки инкубировали в отсутствии AV. На 4-й день клетки CAR Т собирали центрифугированием (4°C, 300 g, 5 мин) и промывали PBS. Для анализа высвобождения ЛДГ клетки Jeko-1 экспрессирующих красный флуоресцентный белок (5×10^3 клеток на лунку) смешивали с CAR Т клетками, обработанными AV, и контрольными CAR Т клетками при соотношении к клеткам-мишеням 10:1, 5:1, 2:1, 1:2 и 1:5 и культивировали в течение 12 часов в полной среде RPMI 1640 с добавлением человеческого ИЛ-2 (30 ед/мл). Кроме экспериментальных лунок, были поставлены контроли, рекомендованные инструкцией к набору. После инкубации к контрольным лункам (таргетные клетки (Jeko-1) без CAR Т клеток добавляли лизирующего буфера и инкубировали 40 мин. Анализ цитотоксичности проводили согласно протоколу CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, США) изготовителя с помощью прибора VarioScan (США).

Для анализа цитотоксичности CAR Т клеток, полученных от пациентов с диагнозом Острый лимфобластный лейкоз, CAR19 Т клетки инкубировали с CD19-AV и отрицательными AV в течение 7 дней. На 7 день CAR Т-клетки смешивали с клетками Jeko-1 (NucLight Red), как описано выше, и оценивали цитотоксичность CAR Т-клеток с помощью набора CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, США).

Определение активности CAR Т-клеток с помощью системы прижизненного анализа клеток Incucyte: Для анализа 3×10^4 клеток-мишеней Jeko-1 red (NucLight Red) объединяли с 9×10^4 контрольных CAR Т клеток и обработанных AV. Клетки ко-культивировали в течение 24 часов при 37°C. В качестве отрицательного контроля использовали 3×10^4 клеток-мишеней без добавления эффекторных клеток. Нормализованное количество

процента живых клеток в каждой временной точке было рассчитано относительно изначального количества живых клеток на точке 0 ч. Для расчета цитолитической активности CAR Т-клеток против клеток-мишеней с течением времени рассчитывалась площадь под кривой (AUC) с помощью программы GraphPad Prism 8.

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

3.6.4 Детекция секреции провоспалительных цитокинов методом ELISA

Анализ секреции провоспалительных цитокинов CAR Т-клетками под действием EV: Для анализа высвобождения цитокинов 5×10^4 клеток CAR19 инкубировали со свежевыделенными Nalm-6 CD19+ или Nalm-6 CD19- экзосомами (на 1 CAR Т-клетку приходилось 25×10^3 EV) в течение 24ч в 96-луночном планшете в отсутствии ИЛ-2. В качестве отрицательного контроля CAR19 Т клетки инкубировали без добавления экзосом. По окончании инкубации супернатант отделяли от клеток центрифугированием (4°C , 300 g, 5 мин), переносили в новый планшет и проводили ИФА. Секрецию ИЛ-2 и ИНФ γ анализировали с помощью наборов цитокин-специфичного ИФА («Вектор-бест», Россия) в соответствии с инструкциями производителя.

Анализ секреции провоспалительных цитокинов CAR Т-клетками под действием AV: Для анализа высвобождения цитокинов CAR19 или IL13-CAR Т клеток (5×10^4 клеток в лунке) инкубировали со свежевыделенными антиген-положительными или neg-AV при соотношениях CAR Т-клеток к AV 10:1, 5:1 или 1:1 в течение 24 ч в 96-луночном планшете. В качестве контроля CAR19 и IL13-CAR Т клетки смешивали с HeLa CD19 и HeLa IL13R2a в 10:1, 5:1 или 1:1. Базальные уровни секреции IFN-g и ИЛ-2 были измерены в образцах CAR Т, не подвергавшихся стимуляции. Супернатант отделяли от клеток центрифугированием (4°C , 300 g, 5 мин), переносили в новый планшет и проводили ИФА. Секрецию ИЛ-2 и ИНФ γ человеческими CAR Т-клетками анализировали с помощью

наборов цитокин-специфичного ИФА («Вектор-бест», Россия) в соответствии с инструкциями производителя.

3.6.5 Получение репортерных клеток Jurkat-NFAT-luc и анализ активации клеток

Для проведения экспериментов активации CAR в различных условиях клетки линии Jurkat-Lucia™ NFAT Cells (InvivoGen, США) трансдуцировали лентивирусными частицами кодирующими химерные антигенные рецепторы.

Инкубация экзосом с клетками Jurkat: 100 мкл супернатанта клеток Nalm-6 CD63-Luc смешивали с $0,5 \times 10^6$ Jurkat модифицированными CAR19 или IL13-CAR и инкубировали при 37°C или 4°C. Во время инкубации отбирали временные точки 10 мин, 30 мин, 1 час, 4 часа в объеме 20 мкл: клетки осаждали, промывали изотоническим буфером и смешивали в соотношении 1:1 в 96-луночной плашке с люциферинном NanoGlo (Promega, США) и измеряли уровень хемилюминесценции (RLU) на приборе VarioScan (США).

Инкубация антигенных везикул с клетками Jurkat. Линия репортерных клеток Jurkat-NFAT-Lucia (Invivogen, Франция) с помощью лентивирусной трансдукции была модифицирована CAR19 или IL13-CAR. Для анализа активации 5×10^4 репортерных клеток Jurkat CAR T смешивали со свежевыделенными антиген-положительными или peg-AV в соотношениях CAR T-клеток к AV (0, 4: 1, 2: 1, 1: 1, 1: 2, 1: 5, 1:10 или 1:20) в 96-луночном планшете и инкубировали в течение 24 часов при 37°C. Супернатант отделяли от клеток центрифугированием (4 °C, 300 g, 5 мин) и переносили в непрозрачный 96-луночный планшет. Активацию репортерных клеток Jurkat-NFAT-Lucia CAR T измеряли по уровню активности люциферазы при добавлении люциферина Quanti-luc Gold (Invivogen, Франция).

3.6.6 Анализ уровня дегрануляции T-клеток

CAR T клетки ресуспендировали в среде TechMACS (Miltenyi Biotech, ФРГ) в концентрации 2×10^6 клеток/мл. 100 мкл клеточной суспензии переносили в 96-луночный планшет и добавляли 2 мкл антитела против CD107a человека (BD, США). CAR T-клетки смешивали с антиген-положительными или peg-AV в соотношении 1:1 или оставляли без обработки (контроль) и инкубировали в течение 2 часов при 4°C. Суспензию клеток дважды промывали средой TechMACS (4°C, 300 г, 5 мин), окрашивали антителами против CD3/CD4/CD8 человека. Уровень дегрануляции анализировали методом проточной цитофлуориметрии.

3.6.7 Выделение мРНК и Nanostring анализ

Для анализа уровня экспрессии мРНК в CAR T-клетках был использован набор CAR T Expression Panel (NCounter, США). Для получения популяции, состоящей исключительно

из модифицированных клеток CAR19 Т клетки сортировали на приборе SH800 Cell Sorter (Sony, Япония). Далее 3×10^5 клеток смешивали с EV (на 1 CAR Т-клетку приходилось 25×10^3 EV) и инкубировали в течение 24 часов. По истечении времени клетки промывали 2 раза раствором PBS и лизировали в 1 мл TRIzol reagent (Qiagen, Германия). К раствору добавляли 200 мкл хлороформа, перемешивали 20-30 секунд и центрифугировали 15 минут при 12000 об/мин на 4°C. Водную фазу переносили в пробирку, содержащую 600 мкл холодного изопропанола. Раствор аккуратно перемешивали переворачиванием пробирки и инкубировали 10 мин на комнатной температуре. Далее пробирки центрифугировали 12000 об/мин 15 мин 4°C, удаляли супернатант, осадок дважды промывали 1000 мкл холодного 70% этанола с промежуточным этапом центрифугирования (12000 rpm 15 мин 4°C). Осадок сушили на 60°C в течении 10 мин, ресуспендировали в 10 мкл mQ свободной от РНКаз и измеряли концентрацию полученной РНК на спектрофотометре NanoDrop (США). В реакцию гибридизации брали РНК в концентрации от 70 до 300 ng/mkl. Анализ проводили с помощью прибора nCounter согласно рекомендациям производителя. Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения nSolver Analysis Software в Advanced режиме.

3.6.8 Изучение пролиферативной активности CAR Т клеток

На 4 день после трансдукции 2×10^6 CAR19 Т клеток помещали в среду без добавления ИЛ-2 и инкубировали в течение 48 часов. Далее мембрану клеток метили 1 мкл реагента CellTrace CFSE (Invitrogen, США) в течение 5 минут при 37°C и дважды промывали PBS. 5×10^5 CFSE-меченных CAR Т-клеток смешивали со свежевыделенными CD19-AV и neg-AV в соотношении 1:1. В качестве положительного контроля клетки CAR Т, меченные CFSE, культивировали в присутствии 30 ед/мл ИЛ-2. Клетки культивировали до 1 недели, культуральную среду заменяли свежей средой, содержащей AV (такое же количество, как в начале инкубации) каждые 48 часов. На 4 день совместной инкубации клетки окрашивали антителами против CD19 человека FITC (Acro Biosystems, США), APC против CD4 человека (Biolegend, Великобритания) и PE антителами против CD8 человека (Biolegend, Великобритания) и анализировали пролиферацию клеток методом проточной цитофлуориметрии.

3.6.9 Анализ истощения и дифференциации CAR Т-клеток под действием AV

На 4 день после трансдукции, 1×10^6 CAR19 Т клеток стимулировали различными активирующими агентами:

- CD3/CD28 Dynabeads (Thermo Scientific, США) в присутствии 30 Ед/мл ИЛ-

- 30 Ед/мл IL-2
- 2×10⁵ CD19-AV
- 2×10⁵ HeLa CD19 клеток

Стимулированные клетки культивировали в течение 14 дней (37°C, 5% CO₂) с поддержанием концентрации клеток, не превышающей 2,5×10⁶ / мл. Каждые 48 часов добавляли свежие CD19-AV. На 2, 4, 7 и 14 дни клетки подсчитывали и определяли кратное увеличение путем деления количества клеток в разные моменты времени на количество клеток в начале эксперимента. На 4, 7 и 14 дни клетки также окрашивали антителами CD19-Fc FITC (R&D Systems, США), CD4 APC (Biolegend, Великобритания) и CD8-PE (Biolegend, Великобритания), CD45RA-PE (Biolegend, Великобритания), CD62L-APC (Biolegend, Великобритания), CD57-PE. -Cy7 (Miltenyi, США), TIGIT-PE-Cy7 (Miltenyi, США) и PD-1-APC (Miltenyi, США) и анализировали статус дифференцировки и истощения CAR T-клеток.

3.6.10 Внутриклеточная детекция провоспалительных цитокинов CD45^Δ T клеток

По 3×10⁵ T и CD45^Δ T клеток (от 2 здоровых доноров) смешивали с Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 на второй неделе после нокаута гена CD45 в соотношении 1:1 в RPMI-F без ИЛ-2 и инкубировали при 37 °C 5% CO₂ в течение 18 ч. Положительные контрольные лунки, содержащие только эффекторные клетки без Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28, активировали 40 нМ форболового эфира и 1 мкМ иономицина за 3 ч до окончания активации Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 в экспериментальных лунках. Лунки с неактивированными эффекторными клетками служили отрицательным контролем.

После инкубации к клеткам добавляли 10 мкг/мл брефельдина А (Sigma, США) и инкубировали при 37 °C с 5% CO₂ в течение 3 ч. Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 удаляли с помощью DynaMag (Thermo Fisher Scientific), а клетки промывали PBS при комнатной температуре (5 мин, 500×g) в Centrifuge 5810R. Затем клетки блокировали 5% FBS, окрашивали антителами к человеческим CD45, CD4 и CD8a при комнатной температуре в течение 15 мин в темноте, промывали PBS при комнатной температуре (5 мин, 500×g) и фиксировали буфером для фиксации при 4 °C в течение 20 мин в темноте. После фиксации клетки отмывали буфером для пермеабилзации при комнатной температуре (5 мин, 500×g), блокировали 5% FBS, окрашивали антителами к человеческому интерферону гамма (ИНФ-γ) и ИЛ-2 в течение 40 мин при комнатной температуре в буфере для пермеабилзации в темноте. Затем дважды промывали PBS при комнатной температуре

(5 мин, 500×g) и ресуспендировали в 120 мкл PBS. Результаты оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии.

3.6.11 Анализ активности ДНКазы I

Концентрацию ДНКазы I в среде для культивирования клеток и образцах плазмы анализировали с помощью флуоресцентного зонда, представляющего шпильку олигонуклеотида, меченного флуоресцентным красителем и гасителем. Увеличение флуоресценции контролировали с помощью планшетного ридера Varioscan Flash (Thermo Scientific, США). Культуральную среду и образцы плазмы в 20 раз разводили реакционным буфером. В реакции использовали флуоресцентный зонд в концентрации 0,25 мкМ. Калибровочная кривая оценки концентрации ДНКазы I была получена с использованием разведений рекомбинантной ДНКазы I (Pulmozyme®, Dornase alfa) (Genentech, Южный Сан-Франциско, Калифорния, США) при условии, что ее концентрация составляет 1 мг/мл и Mw 31 кДа в соответствии с данными поставщика.

3.7 Работа с животными

3.7.1 Получение опухолевых клеток, экспрессирующих ген люциферазы

Опухолевые клетки KB, PC-3, A549, SKOV-3, SK-BR-3, Jurkat, MC38 и Nalm-6, экспрессирующие гены GFP и люциферазы светлячка (ffLuc), получали методом лентивирусной трансдукции FLuc-F2A-GFP-IRES-Hygro, затем отбирали с помощью 200 мкм/мл гигромицина (Thermo Fisher Scientific, США). Для визуализации мышей с подсаженными опухолями их анестезировали ингаляционным изофлураном с последующей внутрибрюшинной инъекцией D-люциферина (GoldBio, США). Через 10 мин, чтобы обеспечить распределение люциферина, мышей визуализировали с помощью системы оптической визуализации IVIS Lumina II (PerkinElmer Inc.) в соответствии с инструкциями производителя. Анализ полученных данных проводили с использованием программного обеспечения для живых изображений (PerkinElmer Inc.). Интересующие области были выбраны вручную и количественно определены для среднего потока фотонов (фотоны/секунда/см²/стерадиан).

3.7.2 Анализ эффективности CAR19 T клеток после культивации с AV in vivo

Животные содержались в специальных, свободных от патогенов условиях в Пушкинском животноводческом комплексе БИБЧ РАН (биоресурсный сборник «Коллекция лабораторных грызунов категории SPF для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований»).

В экспериментах изучения эффективности CAR T клеток обработанных искусственными везикулами использовали самок и самцов мышей NCG (NOD.CBA-Rag1^{null}/Nju) в

возрасте от шести до восьми недель со средним весом от 16 до 20 г. Мышам вводили 1×10^6 клеток Nalm-6 pCDH-ffluc в 100 мкл PBS в хвостовую вену. При развитии опухоли, мышей распределяли в экспериментальную и контрольную группы. На 5 день после введения опухоли животным внутривенно вводили 2×10^6 CAR19 Т клеток, обработанных CD19-AV, стимулированных ИЛ-2, либо контрольные Т клетки. Динамику роста опухоли контролировали каждые 4 дня с использованием системы визуализации IVIS Spectrum In vivo (PerkinElmer, Китай) после внутрибрюшинной инъекции D-люциферина (GoldBio, США).

3.7.3 Анализ эффективности CD45Δ CAR Т клеток *in vivo*

В экспериментах изучения эффективности CD45Δ CAR19 Т клеток мышам линии NCG (NOD.CBA-Rag1^{knout}/Nju) внутривенно вводили 1×10^6 CD19-позитивных Nalm-6 ffluc/GFP, в 100 мкл PBS. Затем животные были случайным образом распределены на 2 экспериментальные и 1 контрольную группы. Зараженным мышам вводили внутривенно 5×10^6 CD45Δ CAR19 Т клеток, CAR19 Т клеток или нетрансдуцированных Т клеток (контрольная группа) на 7 день после приживления опухоли. За развитием опухолей наблюдали еженедельно в течение 5 недель.

В экспериментах изучения эффективности CD45Δ CAR45 Т клеток мышам линии NCG внутривенно вводили 2×10^6 CD45-позитивных THP-1 ffluc/GFP, в 100 мкл PBS. Затем животные были случайным образом распределены на 2 экспериментальные и 1 контрольную группы. Зараженным мышам вводили внутривенно 5×10^6 CD45Δ CAR45 Т клеток, CAR45 Т клеток или Mock Т клеток (контрольная группа) на 3 день после приживления опухоли. За развитием опухолей наблюдали еженедельно в течение 11 недель, начиная с 6 дня после инъекции THP-1.

В экспериментах с PBMC мышам линии NCG внутривенно вводили 20×10^6 периферические мононуклеарные клетки здорового донора. Через 2 недели мышей случайным образом распределили на экспериментальную и контрольную группы и вводили им внутривенно по 10×10^6 аутологичных CD45Δ CAR45 Т клеток, CD45Δ CAR19 Т клеток или CD45Δ Mock Т клеток (контрольная группа). Динамику химеризма (доли человеческих CD45-позитивных клеток) измеряли методом проточной цитофлуориметрии. Образцы крови для этого забирали раз в две недели, начиная с 4 недели после введения PBMC.

3.7.4 Анализ эффективности регулируемых Bs-CAR Т клеток *in vivo*

Животные содержались в специальных, свободных от патогенов условиях в Пушкинском животноводческом комплексе БИБЧ РАН (биоресурсный сборник «Коллекция лабораторных грызунов категории SPF для фундаментальных, биомедицинских и

фармакологических исследований»). Для экспериментов с BsCAR были взяты мыши линии NCG (NOD.CBA-Rag1^{<null>}/Nju) 6-8 недель, предоставленные питомником лабораторных животных города Пущино Московской области (коллекция лабораторных грызунов категории СПФ для фундаментальных, медико-биологических и фармакологических исследований, Россия). Мышам, весом 16-20 грамм, подкожно вводили 2×10^6 BT-FLuc клеток в 30% матрикеле в 100 мкл полной культуральной среды. Как только опухоль достигала пальпируемого объема рандомизировали и делили на группы ($n=6$). Животным из всех групп внутривенно вводили 10×10^6 BsCAR T клеток. Через 4 ч после инъекции BsCAR T клеток мышам начинали вводить 9.29-барназу и G3-барназу. Дозы дарпин-барназы увеличивали в соответствии с установленным протоколом (5, 50 и 500 нмоль/кг соответственно). Далее делали перерыв в 7–8 дней, и затем цикл повторяли два раза. Динамику роста опухоли определяли каждые 10 дней с использованием системы визуализации IVIS Spectrum In vivo (PerkinElmer) после внутрибрюшинной инъекции D-люциферина (GoldBio). Дополнительно, объем опухоли измеряли штангенциркулем и оценивали по эллипсоидальной формуле: $V = \frac{1}{2} (\text{длина} \times \text{ширина}^2)$.

3.7.5 Анализ эффективности регулируемых CovCAR T клеток *in vivo*

Все эксперименты с животными проводились в соответствии с протоколом номер 06-0325, одобренным Комитетом по уходу за животными и использованию животных при Институте исследований Скриппса (The Scripps Research Institute, США). Для производства CAR T клеток были использованы лимфоциты, полученные из крови здоровых анонимных доноров крови человека рекрутированных через программу Scripps Research NBDS.

Анализ противоопухолевой активности CovCAR T клеток в отношении опухоли экспрессирующей фолатный рецептор. Самки мышей штамма NSG (NOD.Cg-Prkdc scid Il2rg tm1Wjl /SzJ6, Jackson Laboratory) в возрасте 6–8 недель были подкожно инокулированы 2×10^6 клеток KB/ffluc, экспрессирующих FR1 и затем получили внутривенную инъекцию 10×10^6 CovCAR T клеток. Далее мышам, в течение следующих 15 дней, ежедневно интраперитонеально вводили либо PBS, либо фолат-дикетон (75 нмоль/кг). Поскольку в обычной кормовой смеси для грызунов содержится высокий уровень фолатов, что повышает уровень фолатов в сыворотке до значений, превышающих нормальные физиологические показатели, мыши содержались на специальной диете с пониженным содержанием фолиевой кислоты (Envigo, США).

Анализ противоопухолевой активности CovCAR T клеток в отношении опухоли, экспрессирующей PSMA. Самки мышей штамма NSG (NOD.Cg-Prkdc scid Il2rg tm1Wjl /SzJ6, Jackson Laboratory) в возрасте 6–8 недель были подкожно инокулированы 1×10^6

клеток PC-3-PSMA/ffluc. На 8-й день после введения опухоли, животным из всех экспериментальных групп внутривенно вводили 10×10^6 CovCAR T клеток с эффективностью трансдукции около 70%. Затем мышам внутривенно вводили либо физиологический раствор (PBS), либо увеличивающиеся дозы конъюгатов DUPA-3-дикетон, DUPA-4-дикетон или DUPA-5-дикетон (по 5 нмоль/кг на 8-й день, 50 нмоль/кг на 10-й день, 500 нмоль/кг на 12-й день). После первого курса терапии животным предоставляли отдых в течение 10 дней, после чего цикл повторяли. Такой режим увеличивающихся доз небольших лекарственных соединений использовался для достижения оптимального баланса между пролиферацией CAR T клеток и отсутствием заметных токсических эффектов. В экспериментах с постоянной дозировкой DUPA-3-дикетона мышам штамма NSG подкожно инокулировали 1×10^6 клеток PC-3-PSMA/ffluc. На третий день после инокуляции опухоли внутривенно вводили по 10×10^6 CovCAR T клеток с эффективностью трансдукции около 65%. Затем мышам внутривенно вводили либо PBS, либо DUPA-3-дикетон (500 нмоль/кг) на дни 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 и 17 после инокуляции опухоли.

3.7.6 Анализ фармакологического контроля активации и пролиферации CovCAR T-клеток после введения адаптера-дикетона

Самки мышей штамма NSG в возрасте 6–8 недель были подкожно инокулированы 1×10^6 клеток PC-3-PSMA (без люциферазы). На 12-й день после инокуляции опухоли мыши из всех экспериментальных групп получили внутривенное введение 10×10^6 CovCAR T клеток T, экспрессирующих люциферазу. Затем мышам внутривенно вводили либо PBS, либо увеличивающиеся дозы адаптера DUPA-3-дикетон (по 5 нмоль/кг на 12-й день, 50 нмоль/кг на 14-й, 500 нмоль/кг на 16-й, затем по 5 нмоль/кг на 29-й, 50 нмоль/кг на 31-й и 500 нмоль/кг на 33-й день). Пролиферацию CovCAR T клеток оценивали введением D-люциферина и визуализации биолуминесценции с помощью системы IVIS. Для определения концентрации цитокинов в сыворотке крови у мышей отбирали 50 мкл крови на 4-, 9- и 22-й день после инфузии CovCAR T клеток. Концентрации цитокинов измеряли с помощью мультиплексного набора LEGENDplex (BioLegend, 741065 согласно инструкциям производителя).

3.7.7 Анализ эффективности опухоль-специфичных CAR T клеток *in vivo*

Все процедуры с животными проводились в строгом соответствии с рекомендациями по надлежащему использованию и уходу за лабораторными животными. Проводимые действия были одобрены Институтом по уходу и использованию животных Межинститутской комиссией по биоэтике Сибирского отделения Российской академии наук (СО РАН) для экспериментов в Центре генетических ресурсов лабораторных

животных Института цитологии и генетики СО РАН. Животных содержали в безпатогенных условиях в виварии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Для экспериментов на использовали самок мышей штамма NOD.SCID (CB17-Prkdc^{scid}/NcrCr1) в возрасте от шести до восьми недель со средним весом от 16 до 20 г. Опухоли прививали введением 5×10^6 клеток Raji-ФЛ1 (реконструированный В-клеточный рецептор фолликулярной лимфомы пациента) в 200 мкл 0,9% солевого раствора подкожно в левый бок животного. При достижении объема опухоли не менее 50 мм³, животных случайным образом распределяли в экспериментальные и контрольные группы. На 17-й день после инокуляции опухоли Raji мышам внутривенно вводили 3×10^6 ФЛ1-CAR, CAR19 или Мус-CAR Т клеток. Объем опухоли измеряли штангенциркулем и оценивали по эллипсоидальной формуле: $V = \frac{1}{2} (\text{длина} \times \text{ширина}^2)$. Опухоли контролировали с использованием системы визуализации In-Vivo MS FX PRO (Carestream, Чехия) после внутрибрюшинной инъекции D-люциферина (GoldBio, США). Животных подвергали эвтаназии, когда объем опухоли достигал 2 см³. На 38-й день после введения клеток Raji и на 21-й день после введения CAR Т клеток за 10 мин до эвтаназии мышам вводили 150 мкл (4,29 мг на каждую особь) водного раствора D-люциферина, затем собирали головной мозг, легкие, сердце, печень, селезенку, почки и опухоли. Каждый орган промывали PBS и визуализировали интенсивность биolumинесценции с использованием системы визуализации In-Vivo MS FX PRO. Для проведения цитофлуориметрического анализа у животных из каждой экспериментальной группы также выделяли клетки крови, селезенки и костного мозга. Эритроциты лизировали буфером для лизиса эритроцитов (0,15 М NH₄Cl, 10 мМ NaHCO₃ и 0,1 мМ ЭДТА). Клетки окрашивали антителами, специфичными к CD3 (для образцов крови), CD45RA и CCR7, и анализировали с помощью проточного цитометра NovoCyte (ACEA Biosciences, США). Опухоли фиксировали в 4% формальдегиде в течение 2-х недель и подвергали парафиновой срезке по стандартным протоколам.

3.7.8 Работа с мышами линии C57BL/6

Самцы и самки мышей дикого типа (C57BL/6) были приобретены в Jackson Laboratories (Бар-Харбор, Мэн, США). Протоколы для животных были одобрены комитетом по уходу за животными и их использованию Университета штата Огайо, и эксперименты проводились в соответствии с рекомендациями Национального института здравоохранения. Для создания модели метастазов печени мышей под наркозом помещали в положение лежа на спине и после дезинфекции кожи в зоне операции был выполнен средний разрез брюшной полости с последующей мобилизацией двенадцатиперстной кишки для идентификации воротной вены. Один миллион клеток MC38 вводили в

воротную вену с помощью иглы 30-G. После удаления иглы кровотечение останавливали, осторожно нажимая на место прокола ватным тампоном. После инъекции кишечник был перемещен, а брюшная стенка ушита нерассасывающимися швами. Через 4 дня после введения опухолевых клеток MC38 животным внутривенно вводили ААВ $1,05 \times 10^{12}$ копий гена/мышь. Образцы крови животных собирали до и через 21 день после инъекции MC38. Анализ метастаз печени и TILs проводили через 21 день после инъекции MC38.

3.7.9 Иммуногистохимия

Для проведения иммуногистохимического анализа опухоли мышей резецировали и фиксировали в формалине. Слайды депарафинизировали и регидратировали два раза в ксилоле в течение 5 минут, два раза в 100% этаноле в течение 5 минут, два раза в 95% этаноле в течение 1 минуты, затем 5 минут в проточной H_2O . Для демаскировки антигена срезы нагревали с использованием микроволновой печи (Vector Laboratories, Burlingame, CA, США). После подавления эндогенных пероксидаз, предметные стекла блокировали в 10% козьей сыворотке (Vector Laboratories, Россия) в течение 1 часа при 25°C. Срезы инкубировали с первичными антителами против CD45 (1: 500 в течение ночи при 4 °C) (BD Pharmagin, Сан-Диего, Калифорния, США), CD4 и CD8 (1: 500 в течение ночи при 4°C) (Abcam, Великобритания.). После трех промывок в PBS слайды инкубировали со вторичным антителом в течение 45 минут при 25°C. Далее слайды контрастировали гематоксилином. Для постановки отрицательного контроля срезы инкубировали только с вторичными антителами. Далее определяли процент клеток, окрашенных положительно в 10 случайных областях срезов при увеличении $\times 400$ под световой микроскопией.

3.7.10 Идентификация и реконструкция В-клеточного рецептора клеток лимфомы

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

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

4) каппа-FITC, λ -PE и CD19-PE/Cy7.

Образцы биопсии, обработанные RNeasy, использовали для выделения общей мРНК с использованием набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Тотальную комплементарную ДНК синтезировали путем обратной транскрипции с использованием набора QuantiTect (QIAGEN). Гены переменных областей тяжелых и легких цепей Ig амплифицировали отдельно друг от друга. ПЦР проводили с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Q5 (New England Biolabs (NEB)) с набором прямых праймеров для переменных генов (V), специфичных для семейства, и обратного праймера, специфичного для константной части генов (C) (Таблица 3.1). Продукты первого ПЦР подвергали гетеродуплексному анализу в полиакриламидном геле, чтобы отличить гомодуплексы (моноклональные продукты ПЦР) от размазанных, медленно движущихся гетеродуплексов (полученных из поликлональных лимфоцитов). Фрагменты ДНК ожидаемого размера выделяли из геля. Проксимальный специфический для гена C обратный праймер использовали для второй стадии амплификации и секвенирования. Идентифицированные переменные фрагменты В-клеточного рецептора были клонированы в виде scFv в лентивирусный вектор pLV2-Fc-MTA, кодирующий Fc-фрагмент, прикрепленный к мембране. Этими вирусами трансдуцировали клетки Jurkat и Raji. Трансдуцированные Jurkat-ФЛ и Raji-ФЛ анализировали и отбирали клетки с реконструированным В-клеточным рецептором.

Таблица 3.1 Праймеры для амплификации генов, кодирующих переменные области тяжелых (VH) и легких цепей (каппа (k), лямбда (L)) иммуноглобулинов

Название	Последовательность
VH1aSal	TAATGCTCTAGA CAGGTCAGCTGGTGCAGTCTGG
VH1bSAL	TAATGCTCTAGA CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGG
VH1cSAL	TAATGCTCTAGA SAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGG
VH1dSAL	TAATGCTCTAGA CARATGCAGCTGGTGCAGTCTGG
VH2aSAL	TAATGCTCTAGA CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGG
VH2bSAL	TAATGCTCTAGA CAGGTCACCTTGARGGAGTCTGG
VH3aSAL	TAATGCTCTAGA GARGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
VH3bSAL	TAATGCTCTAGA CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
VH3cSAL	TAATGCTCTAGA GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGG
VH3dSAL	TAATGCTCTAGA GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
VH4aSAL	TAATGCTCTAGA CAGSTGCAGCTGCAGGAGTCSGG
VH4bSAL	TAATGCTCTAGA CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGG
VH5aSAL	TAATGCTCTAGA GARGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
VH6aSAL	TAATGCTCTAGA CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG
VH7aSAL	TAATGCTCTAGA CAGGTSCAGCTGGTGCAATCTGG
IH1-2Bss	TAATCCCAAGCTT GCTGAGGAGACRGTGACCAGGGTGCC
IH3Bss	TAATCCCAAGCTT GCTGARGAGACGGTGACCATTGTCCC
IH4-5Bss	TAATCCCAAGCTT GCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC
IH6Bss	TAATCCCAAGCTT GCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC

Vk1aXba	TAACGCGTCGACC RACATCCAGATGACCCAGTCTCC
Vk1bXba	TAACGCGTCGACC GMCAATCCAGTTGACCCAGTCTCC
Vk1cXba	TAACGCGTCGACC GCCATCCRGATGACCCAGTCTCC
Vk1dXba	TAACGCGTCGACC GTCACTCTGGATGACCCAGTCTCC
Vk2aXba	TAACGCGTCGACC GATATTGTGATGACCCAGACTCC
Vk2bXba	TAACGCGTCGACC GATRTTGTGATGACTCAGTCTCC
Vk3aXba	TAACGCGTCGACC GAAATTGTGTTGACRCAGTCTCC
Vk3bXba	TAACGCGTCGACC GAAATAGTGATGACGCAGTCTCC
Vk3cXba	TAACGCGTCGACC GAAATTGTAATGACACAGTCTCC
Vk4aXba	TAACGCGTCGACC GACATCGTGATGACCCAGTCTCC
Vk5aXba	TAACGCGTCGACC GAAACGACACTCACGCAGTCTCC
Vk6aXba	TAACGCGTCGACC GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC
Vk6bXba	TAACGCGTCGACC GATGTTGTGATGACACAGTCTCC
VK1-4Hind	TAACTTGCGCGCC CAGTTTGATHTCCASYTTGGTCCC
VK5Hind	TAACTTGCGCGCC CAGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCC
VL1aXba	TAACGCGTCGACC CCAGTCTGTGCTGACTCAGCCRCC
VL1bXba	TAACGCGTCGACC CCAGTCTGTGYTGACGCAGCCRCC
VL1cXba	TAACGCGTCGACC CCAGTCTGTCGTGACGCAGCCRCC
VL2Xba	TAACGCGTCGACC CCAGTCTGCCCTGACTCAGCCRSS
VL3aXba	TAACGCGTCGACC CTCCTATGWGCTGACTCAGCCACC
VL3bXba	TAACGCGTCGACC CTCCTATGAGCTGACACAGCYACC
VL3cXba	TAACGCGTCGACC CTCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC
VL3dXba	TAACGCGTCGACC CTCCTATGAGCTGATGCAGCCACC
VL4aXba	TAACGCGTCGACC CCAGCYTGTGCTGACTCAATCRYC
VL4bXba	TAACGCGTCGACC CTGCCTGTGCTGACTCAGCCCCC
VL5Xba	TAACGCGTCGACC CCAGSCTGTGCTGACTCAGCCRBC
VL6Xba	TAACGCGTCGACC CAATTTTATGCTGACTCAGCCCCAC
VL7Xba	TAACGCGTCGACC CCAGRCTGTGGTGACTCAGGAGCC
VL8Xba	TAACGCGTCGACC CCAGACTGTGGTGACCCAGGAGCC
VL4/9Xba	TAACGCGTCGACC CCWGCCTGTGCTGACTCAGCCACC
VL10Xba	TAACGCGTCGACC CCAGGCAGGGCTGACTCAGCCACC
VL1Hind	TAACTTGCGCGCC CACCTAGGACGGTGACCTTGGTCCC
VL2-3Hind	TAACTTGCGCGCC CACCTAGGACGGTCAGCTTGGTCCC
VL7Hind	TAACTTGCGCGCC CACCGAGGACGGTCAGCTGGGTCCC

Для получения растворимой формы В клеточного рецептора ФЛ в виде полноразмерного антитела переменные цепи легкой и тяжелой цепи были клонированы в вектор pFUSE (InvivoGen, США) и наработаны с помощью системы экспрессии FreeStyle 293 (Thermo Fisher Scientific, США). Из полученного супернатанта методом аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованным белком G (Protein G сефароза, Thermo Fisher) выделяли рекомбинантные антитела. Анализ содержания антитела в каждой из фракции проводился на приборе Nanodrop. Степень чистоты препарата антител проверяли с помощью

электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле и последующей окраской белков раствором Кумасси R-250.

3.7.11 Селекция низкомолекулярных соединений из библиотеки DEL

Данная часть работы была проведена совместно с сотрудниками подразделения OpenDEL компании WuXi AppTec (Шанхай, Китай). Для проведения селекции был использован рекомбинантный белок внеклеточной части HER2 человека (Met 1–Thr 652) с полигистидиновым тегом на С-конце SinoBiological (10004-H08H) и рекомбинантный человеческий белок PSMA SinoBiological (15877-H07H). Для проведения отбора из библиотеки DEL (WuXi Aptech, Китай) рекомбинантные белки иммобилизовывали на 20 мкл магнитных шариков HisPur Ni-NTA (Thermo Fisher, 88832) в течение 30 минут при комнатной температуре. Далее шарики были трижды промыты по 200 мкл буфера для селекции (1X PBS, 0,05% Tween-20, 10 mM имидозола, 0,1 мг/мл гомогенизированного семени лосося (Invitrogen, AM9680)). Для исключения фонового сигнала, вызванного шариками, был включён отрицательный контроль без добавления целевого белка при тех же условиях. После иммобилизации шарики с белком и библиотекой DEL инкубировали в 100 мкл буфера для селекции в течение 1 часа при комнатной температуре, затем трижды промывали по 200 мкл буфера для селекции и элюировали с помощью 50 мкл буфера при 95 °C в течение 10 минут на термомиксере (Eppendorf) с перемешиванием на скорости 800 об/мин. После элюции из образца взяли 1 мкл для количественной ПЦР. Для увеличения селективности отбора были проведены несколько раундов селекции. После трёх раундов аффинного отбора образцы, собранные на каждом этапе, были количественно проанализированы с помощью системы PCR в реальном времени QuantStudio 7 Flex (Thermo Fisher). Затем продукты были очищены, секвенированы и проанализированы.

3.7.12 Синтез органических соединений

Химические соединения низкомолекулярных адаптеров FITC-дикетон, фолат-дикетон, DUPA-дикетон, а также молекулы, отобранные в результате скрининга DEL библиотек, были синтезированы в лабораториях Фила Барана и Ричарда Лернера (Scripps Research, США), а также компании WuXi AppTec (Шанхай, Китай).

3.7.13 Отбор антител агонистов TrkB

Для создания репортерных клеток гены, кодирующие TrkB и TrkA человека были клонированы в вектор LV2 под контролем промотора EF1a. Полученные лентивирусные конструкции были использованы для наработки лентивирусных частиц и последующей трансдукции клеток, модифицированных репортёрами CRE-бета-лактамаза и NFAT-бета-лактамаза. Для обогащения иммуноглобулинов специфичных к TrkB был проведен дисплей

фаговой комбинаторной библиотеки scFv антител [330, 331]. После проведения двух раундов отбора было собрано около 10^6 колоний, из которых были амплифицированы гены scFv антител, которые клонировали в лентивирусный вектор LV2-Fc-MTA. Полученная суббиблиотека была использована для наработки лентивирусных части и трансдукции репортерных клеток. Клеточные линии репортеров TrkB были инфицированы лентивирусными библиотеками при MOI=2 с помощью спинфекции. Через шесть часов после инфицирования культуральная среда была заменена, и клетки инкубировали ещё 40 часов. Для отбора активированных репортерных клеток к клеткам добавляли субстрат CCF4-AM, для отсоединения адгезионных клеток обрабатывали раствором аккутазы и сортировали методом FACS. В случае экспрессии антитела агониста, репортерная клетка начинает экспрессировать бета-лактамазу, которая расщепляет FRET субстрата CCF4-AM. В результате, при возбуждении светом длиной волны 409 нм возникает флуоресценция при 450 нм, а зелёный сигнал при 520 нм снижается. Самые яркие клетки (1%) отбирали для амплификации, проведения повторного раунда отбора и определения нуклеотидных последовательностей антител-агонистов TrkB.

3.7.14 Эксперименты с эксплантатами сетчатки мыши

Агонисты антител к TrkB и BDNF оценивали на росте дендритов ретинальных ганглиозных клеток мыши (RGC) в культуре эксплантов сетчатки согласно описанному ранее протоколу [332]. Данная часть работы была произведена совместно с компанией Zebra (США) и Школой биологических наук при университетах Кардиффа (Великобритания). Глаза мышей линии C57BL/6 в возрасте от 1,5 до 8,5 месяцев извлекали и помещали в охлажденный раствор Hanks Balanced Salt Solution (Invitrogen Ltd., Paisley, UK). Затем быстро выполняли диссекцию сетчатки на полиэтиленовых вставках из политетрафторэтилена (Millipore, Watford, UK) толщиной 0,4 мкм. Вставки помещали в чашки для культивирования диаметром 35 мм (Millipore), содержащие 1,2 мл среды Neurobasal-A (Invitrogen Ltd.), дополненной 1% пенициллина-стрептомицина (Invitrogen Ltd.), 0,8 mM L-глутамин (Invitrogen Ltd.), 1% добавки N2 (Invitrogen Ltd.) и 2% добавки B27 (Invitrogen Ltd.). Экспланты культивировали при температуре 37 °C и влажности с 5% CO₂ в течение до 14 дней. Далее, экспланты сетчатки содержались в культуре с добавлением или без добавления ZEB85 (50 мкг/мл), ZEB44 (50 мкг/мл) или BDNF (100 нг/мл). После 3 дней экспланты маркировали DiI/DiO, контрастировали DAPI и фиксировали в 4% параформальдегиде. RGCs, определяемые как клетки с телом в слое RGC и аксоном, снимали при 20X увеличении в виде з-стэка (шаги по 1 мкм) с помощью конфокального микроскопа. Для количественной оценки морфологических изменений клетки RGC

трассировали в трех измерениях, а их дендритные отростки анализировали с помощью метода Шолла (Sholl analysis) с использованием программы Simple Neurite Tracer (Fiji). Площадь под кривой Шолла (по модели трапеции) и общая длина дендритов для каждой RGC рассчитывались для подтверждения результатов анализа Шолла.

3.7.15 Статистический анализ

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

4 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Создание опухоль-специфичных CAR T клеток для терапии лимфом и лейкозиев

Основной задачей при создании противоопухолевой иммунотерапии заключается в выборе 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 клетках, несущих CAR (например Т клетках, для предотвращения перекрестной токсичности между CAR клетками). Отличительной особенностью многих лимфом и лейкозиев является наличие уникальных и опухолеспецифичных антигенов – В- и Т-клеточных рецепторов (В cell receptor, BCR; и Т 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 Т клеток.

На сегодняшний день при выборе антиген-распознающих доменов CAR чаще всего используют вариабельные домены известных антител. Данные антитела являются мышиными иммуноглобулинами (FMC63, основной клон при создании CAR к CD19) или их гуманизированными вариантами для снижения иммуногенности химерного рецептора. Такой подход позволяет использовать хорошо охарактеризованные антитела и повышает безопасность создаваемых CAR, однако занимает продолжительное время.

В свою очередь, BCR и TCR опухолевых клеток являются уникальными антигенами, для которых возможно создание индивидуальных CAR для каждого пациента. 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 онкологии, обеспечивая более таргетированное и безопасное лечение, особенно при редких или трудно поддающихся лечению формах рака. Далее будут представлены подходы создания опухоль-специфичных CAR для терапии лимфом и лейкозиев с помощью скрининга лентивирусных библиотек химерных рецепторов и репортерных Т клеток, а также фагового дисплея иммуноглобулинов человека.

4.1.1 Аутокринный отбор лигандов опухолевых клонов для CAR T клеточной терапии В-клеточных лимфом

Для быстрого поиска лигандов В-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 В-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 (**Рисунок 4.1**).

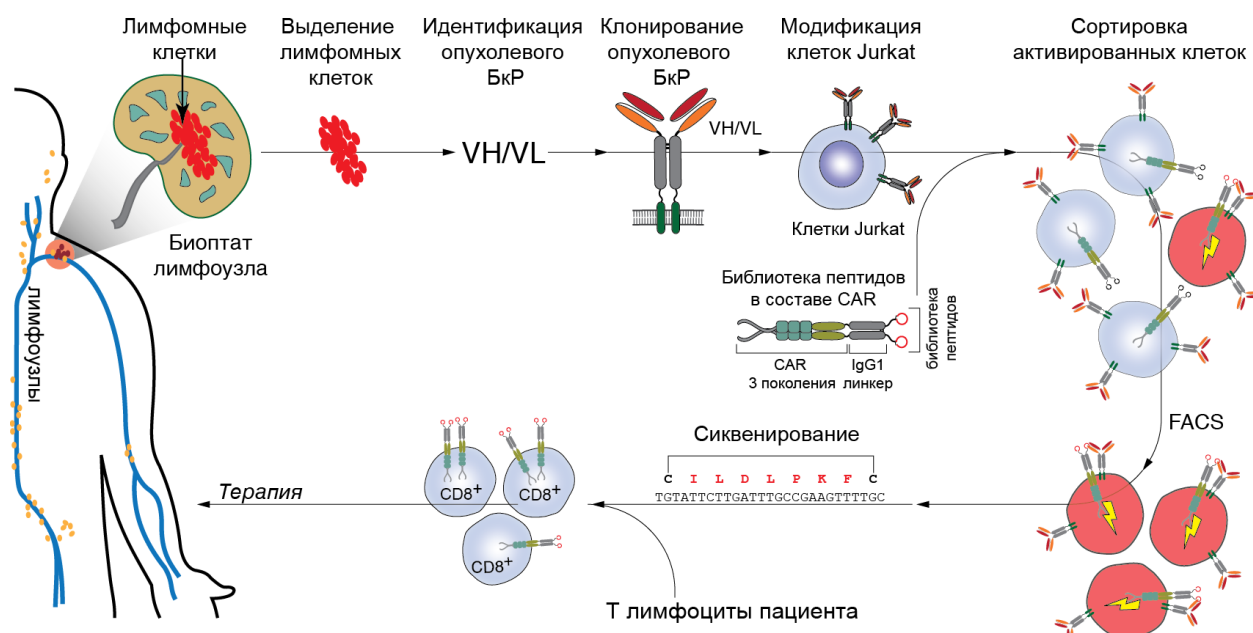


Рисунок 4.1 Схематическое изображение принципа разработанного подхода получения CAR T клеток, направленно элиминирующих опухолевые лимфоциты. Гены В-клеточных рецепторов из биопсии лимфатического узла от пациента с фолликулярной лимфомой (ФЛ) клонировали в виде мембраносвязанных В-клеточных рецепторов (мембранный домен из рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFR)). Их коэкспрессируют 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 Т-лимфоцитов, модифицированных опухолеспецифическим CAR. VH – переменная область тяжелой цепи Ig; VL – переменная область легкой цепи Ig.

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. Анализ нуклеотидных последовательностей амплифицированных генов

вариабельных доменов иммуноглобулинов биоптатов показал высокую гомогенность, более 95% были идентичными и соответствовали опухолевому клону. Далее, для создания репортерных клеток было необходимо получить клетки Jurkat, несущие трансмембранно-заякоренные BCR опухолевых клеток. Для этого вариабельные домены легких и тяжелых цепей BCR были собраны в формате одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), и затем клонированы в вектор pLV2-Fc-MTA, который содержит константный домен антитела Fc и трансмембранный домен рецептора фактора роста тромбоцитов PDGFR (Рисунок 4.2) (данная конструкция была получена ранее в лаборатории Р. Лернера [331]).

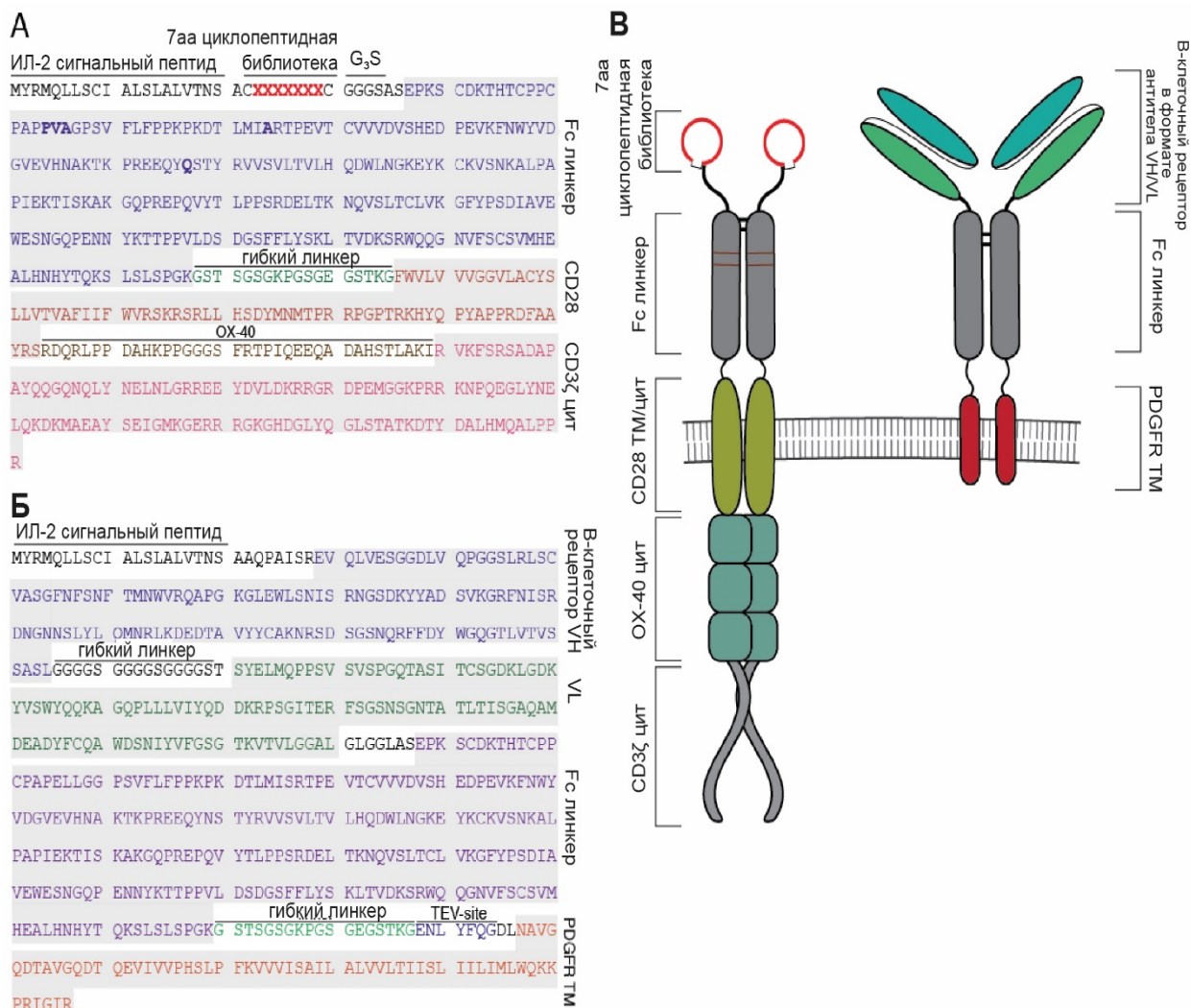


Рисунок 4.2 Структура восстановленного В-клеточного рецептора в формате заякоренного в мембране антитела и комбинаторной библиотеки циклопептидов в составе CAR. А) Аминокислотная последовательность CAR с комбинаторной библиотекой циклопептидов. Б) scFv В-клеточного рецептора через Fc IgG1, заякоренный в мембране трансмембранным доменом PDGFR. В) Схематическое изображение молекул, экспрессируемых клеткой Jurkat

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. 4.3 А**). Клетки Jurkat были выбраны по ряду причин: это суспензионные клетки, которые легче использовать при сортировке больших количеств клеток; данные клетки легко трансдуцировать лентивирусными частицами с высокой эффективностью, что крайне важно при проведении отборов; клетки линии Jurkat высокопролиферативны; клетки Jurkat представляют собой immortalized линию Т-лимфоцитов человека и способны к активации сигнальными доменами CAR. Работоспособность репортерной системы была подтверждена с помощью антитела специфичного к эпитопу с-Мус (клон 9E10) в составе конструкции pLV2-9E10-Fc-MTA и последовательности пептида с-Мус в CAR. Клетки Jurkat, экспрессирующие 9E10-Fc-MTA, активировались после трансдукции Мус-CAR (**Рис. 4.3 Б**).

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. Полученные репортерные клетки трансдуцировали лентивирусной библиотекой циклопептидов в составе CAR. Активированные клетки сортировали методом проточной цитометрии, использовали для амплификации генов белков библиотеки, создания суб-библиотеки и получения новых лентивирусных частиц для повторной трансдукции репортерных клеток. После четырех раундов отбора были отобраны циклопептиды специфичные к BCR опухолевых клеток трех пациентов с ФЛ (**Рис. 4.3 В**).

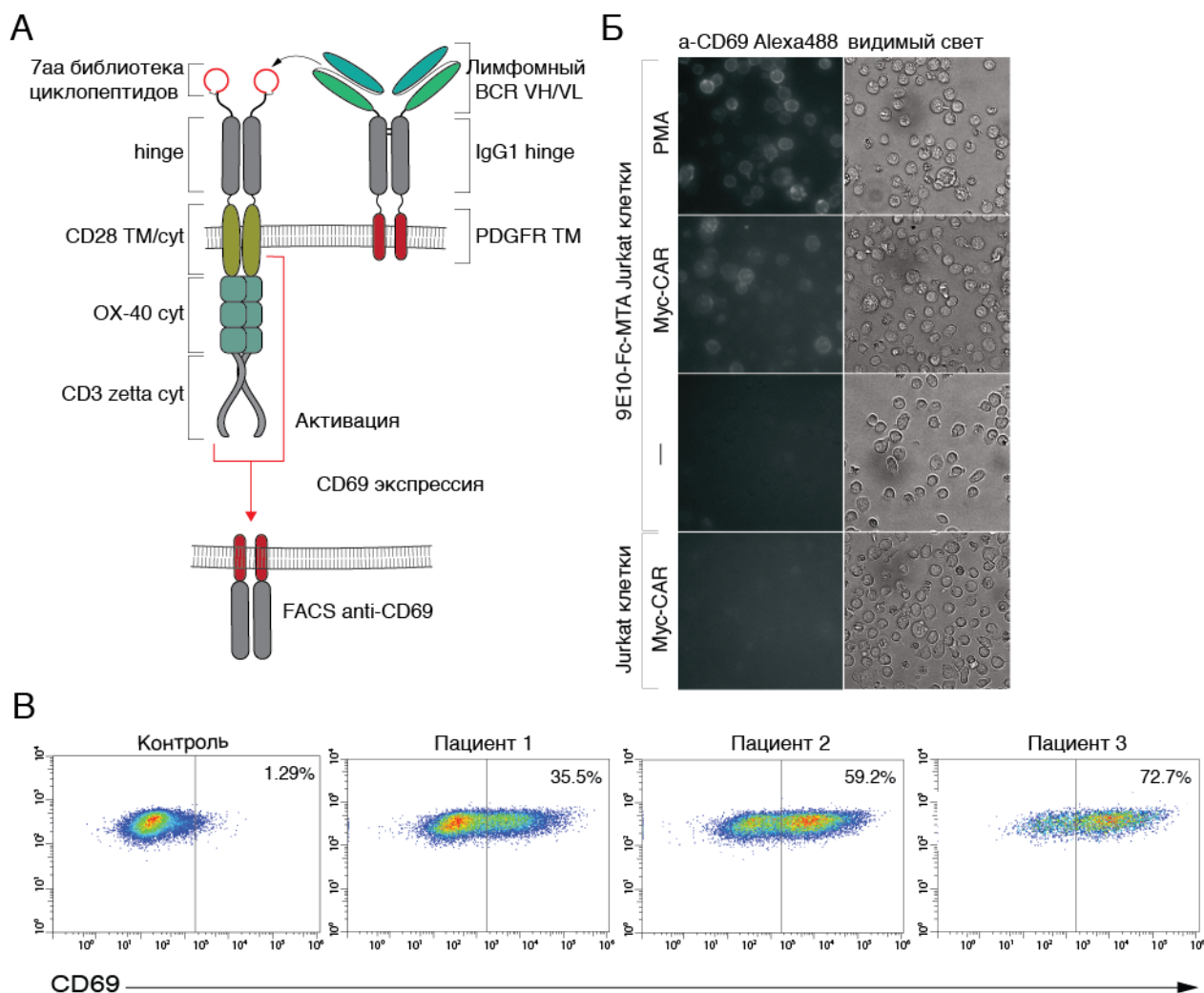


Рисунок 4.3 Аутокринный дисплей библиотеки циклопептидов в составе CAR для поиска лигандов В-клеточных рецепторов лимфоных клеток. (А) Принцип работы репортерной системы. (Б) Подтверждение функциональности созданной репортерной системы с помощью известной пары эпитоп тус и анти-тус антитело (клон 9E10). Для положительного контроля клетки обрабатывались PMA (форбол-12-миристан-13-ацетат), 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.

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 (Рис. 4.4). Дополнительно, специфичность и аффинность найденных пептидов была проанализирована методами ИФА и поверхностного плазмонного резонанса (Рис. 4.5).

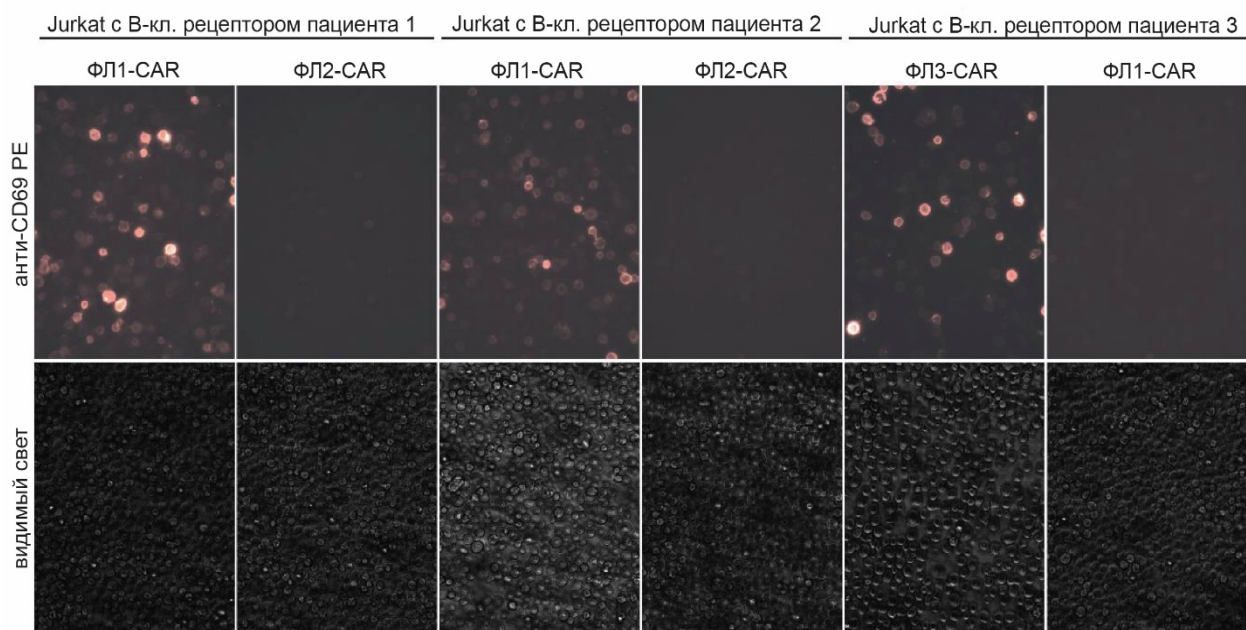


Рисунок 4.4 Отобранные циклопептиды в составе CAR специфически взаимодействуют с опухолевым BCR и активируют репортерные клетки. Репортерные клетки Jurkat-ФЛ1, Jurkat-ФЛ2 и Jurkat-ФЛ3 трансдуцировали конструкциями CAR с отобранными пептидами специфичными к BCR опухолевого клона или пептидами, отобранными для опухоли другого пациента. Активацию репортерных Jurkat визуализировали с помощью флуоресцентной микроскопии клеток, окрашенных антителом анти-CD69-PE.

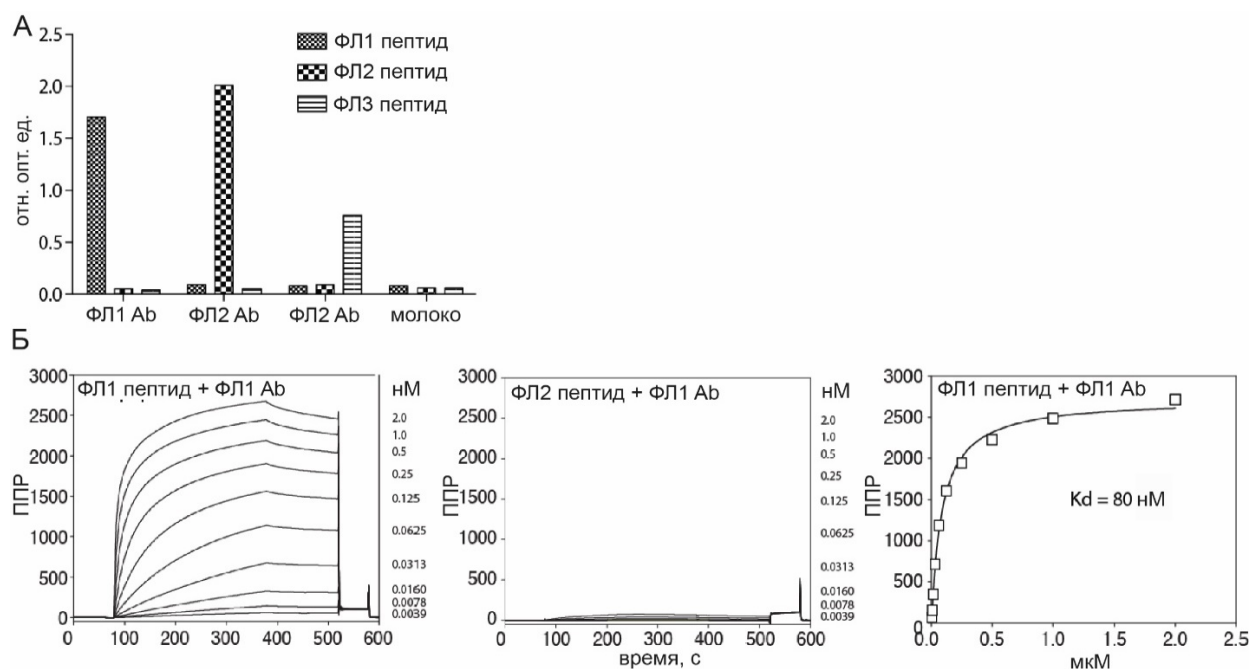


Рисунок 4.5 Отобранные пептиды специфически взаимодействуют с В-клеточными рецепторами в формате антител. А) ИФА взаимодействия выбранных циклопептидов ФЛ1, ФЛ2 и ФЛ3 с В-клеточными рецепторами в формате растворимых рекомбинантных антител ФЛ1 Ab, ФЛ2 Ab и ФЛ3 Ab. Б) ППР-анализ взаимодействия отобранного циклопептида ФЛ1 и злокачественных В-клеточных рецепторов в формате растворимых рекомбинантных антител ФЛ1 Ab и ФЛ3 Ab ($K_d=80$ nM).

Далее была проведена оценка эффективности и специфичности созданных CAR *in vitro* и *in vivo*. Для проведения цитотоксических тестов, клетки линии Raji (получена от пациента с

диагнозом лимфома Беркитта) были трансдуцированы лентивирусами, кодирующими трансмембранно-заякоренные BCR опухолевых клеток. Цитофлуориметрический анализ подтвердил экспрессию BCR в формате scFv-Fc-MTA (**Рис. 4.6 А, сверху**), а также взаимодействие биотинилированных пептидов ФЛ1, ФЛ2 и ФЛ3 с опухолевым В-клеточным рецептором (**Рис. 4.6 А, снизу**).

Клетки Raji-ФЛ1, Raji-ФЛ2 и Raji-ФЛ3 использовали для анализа цитотоксичности Т лимфоцитов человека, модифицированных химерными антигенными рецепторами ФЛ1-CAR, ФЛ2-CAR, ФЛ3-CAR. В качестве положительного контроля цитотоксичности использовали анти-CD19 CAR19 (клон FMC63). 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. 4.6 Б**). Для подтверждения специфичности отбираемых циклопептидов было проведено окрашивание биоптата пациента #1 биотинилированным пептидом ФЛ1. Как видно из данных, приведенных на **рисунке 4.6 В**, пептид ФЛ1 окрашивает популяцию опухолевых В клеток пациента #1 и не окрашивает клетки, изолированные из опухоли пациента #4. Дополнительным подтверждением специфичности отобранных ФЛ1-CAR послужил анализ цитотоксичности CAR Т клеток в отношении лимфомных клеток пациента (**Рис. 4.6 Г**).

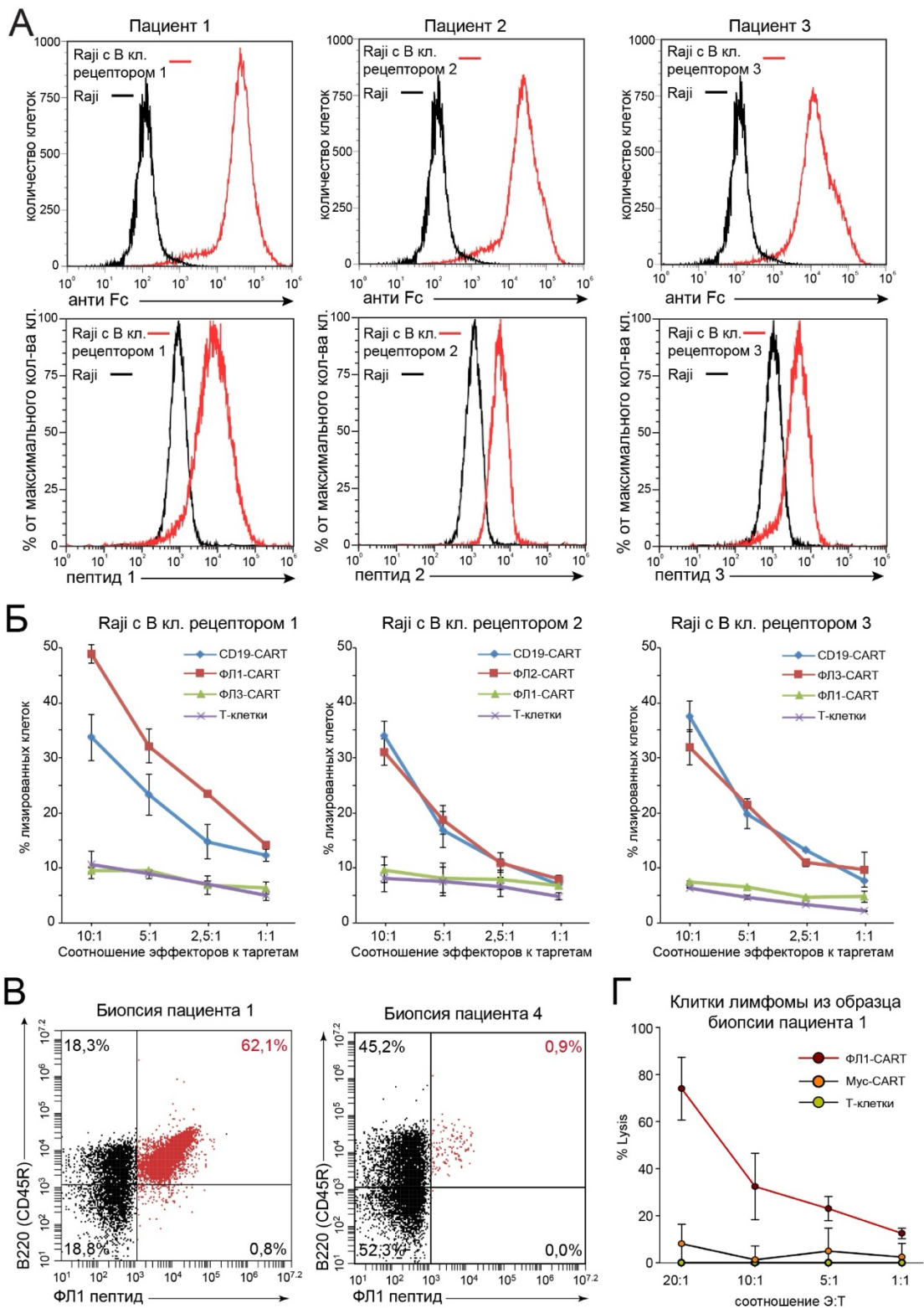


Рисунок 4.6 Отобранные пептиды специфически взаимодействуют с В-клеточным рецептором и направляют CAR T клетки, опосредуя уничтожение опухолевых клеток из соответствующих доноров. (А) Отобранные циклопептиды специфически окрашивают клетки, несущие опухолевые BCR. (Б) Персонализированные CAR T клетки специфически лизируют опухолевые клетки из пациента-источника пептида. (В) Отобранный циклопептид окрашивает опухолевые клетки биоптата пациента 1 и не окрашивает контрольные клетки изолированные из пациента 4. (Г) Персонализированные CAR T клетки специфически лизируют опухолевые клетки, изолированные из биоптата соответствующего пациента с диагнозом фолликулярная лимфома.

Было проведено сравнение терапевтической эффективности персонифицированных ФЛ1-CAR и CAR19 Т клеток на животной модели фолликулярной лимфомы (**Рис. 4.7**). Иммунодефицитным мышам линии NOD.SCID (SCID; CB17-Prkdc^{scid}/NcrCr1) были подкожно введены 5 миллионов опухолевых клеток Raji-ФЛ1, несущих BCR опухолевых лимфоцитов пациента. Через 17 дней животные со сформировавшимися опухолями были разделены на три группы. Животным из экспериментальных групп внутривенно вводили $5 \cdot 10^6$ CAR19, контрольных Мус-CAR или персонифицированных ФЛ1-CAR CD8⁺ Т клеток (**Рис. 4.7 А**). Полученные результаты демонстрируют практически одинаковую терапевтическую эффективность ФЛ1-CAR и CD19 CAR Т клеток. Инъекция ФЛ1-CAR или CAR19 Т клеток значительно снижала опухолевую нагрузку и улучшала выживаемость мышей по сравнению с контрольными группами, которым вводили Мус-CAR Т клеток (**Рис. 4.7 В, Г**). Цитофлуориметрический анализ фенотипа в периферической крови, костном мозге и селезёнке показал, что в периферической крови высокий процент эффекторных клеток памяти, тогда как селезенка и костный мозг были заселены центральными клетками памяти (**Рис. 4.7 Д, Е**). Данные популяции Т клеток играют важную роль в персистенции и продолжительной противоопухолевой активности.

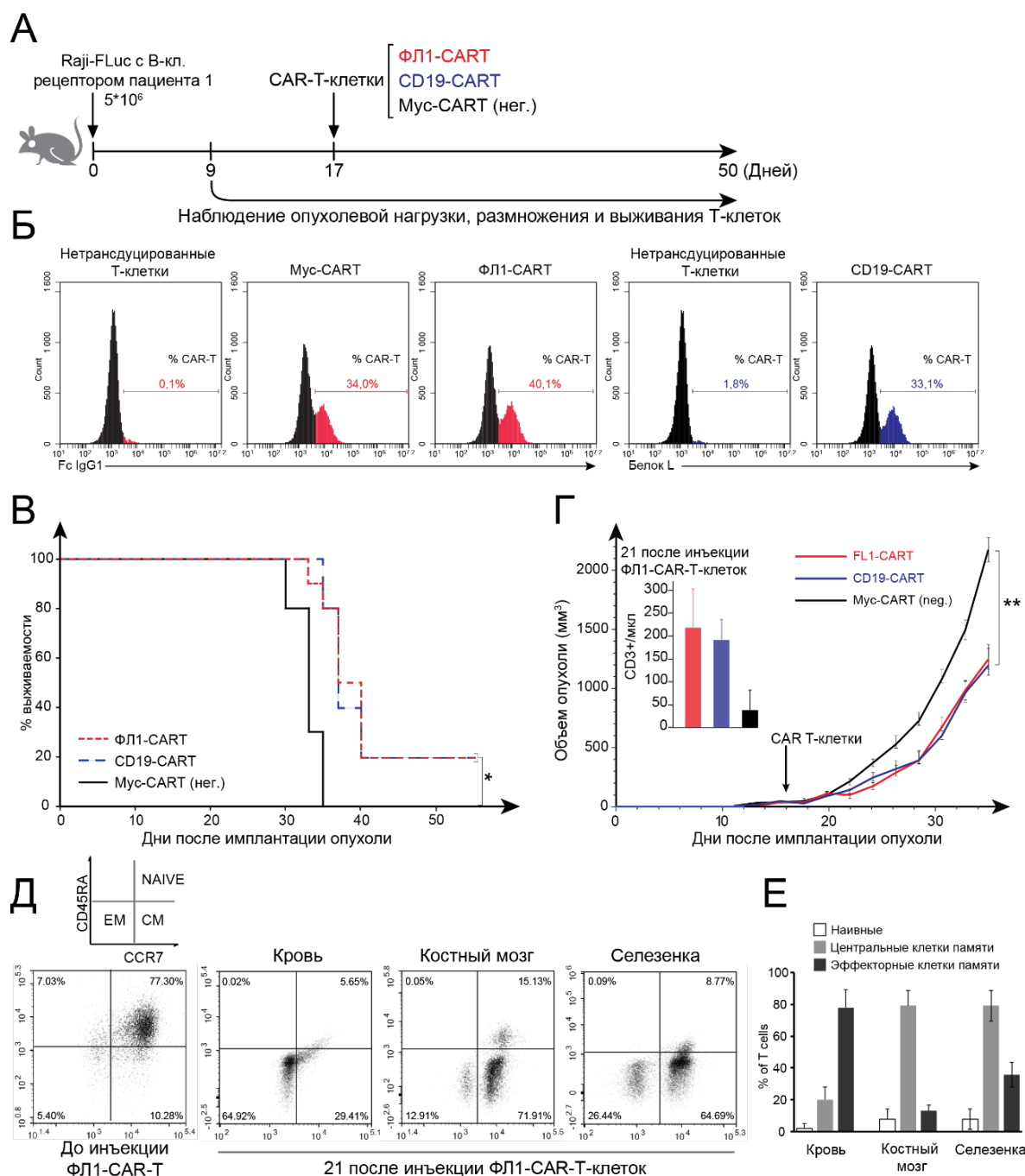


Рисунок 4.7 Анализ эффективности персонифицированных ФЛ1-CAR и CAR19 Т клеток на животной модели фолликулярной лимфомы. А) Схема эксперимента. Мышам NSG прививали 5×10^6 клеток Raji-ФЛ1. После рандомизированного разбиения на группы на 17-й день мышам внутривенно вводили 3×10^6 ФЛ1-CAR, CAR19 или Мус-CAR 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 (n=12). Кривые общей выживаемости строили по методу Каплана-Мейера и сравнивали с помощью логарифмического критерия (Мантела-Кокса) (* P < 0,01). (Г) Динамика роста опухоли у животных из экспериментальных групп ФЛ1 (** P < 0,05, непарный t – критерий Стьюдента). Д, Е) Цитофлуориметрический анализ фенотипа CAR Т клеток в периферической крови, костном мозге и селезенке.

Биолюминесцентный анализ распределения опухолевых клеток Raji-ФЛ1/ffluc в органах экспериментальных животных показал, что введение ФЛ1-CAR или CAR19 Т клеток предотвращает метастазирование ксенотрансплантата, в отличие от группы с введенными контрольными Мус-CAR Т клеток (**Рис. 4.8 А**). Гистологический анализ срезов опухолей показал инфильтрацию Т лимфоцитов в сайт опухоли в группах ФЛ1-CAR и CAR19 (**Рис. 4.8 Б, В**).

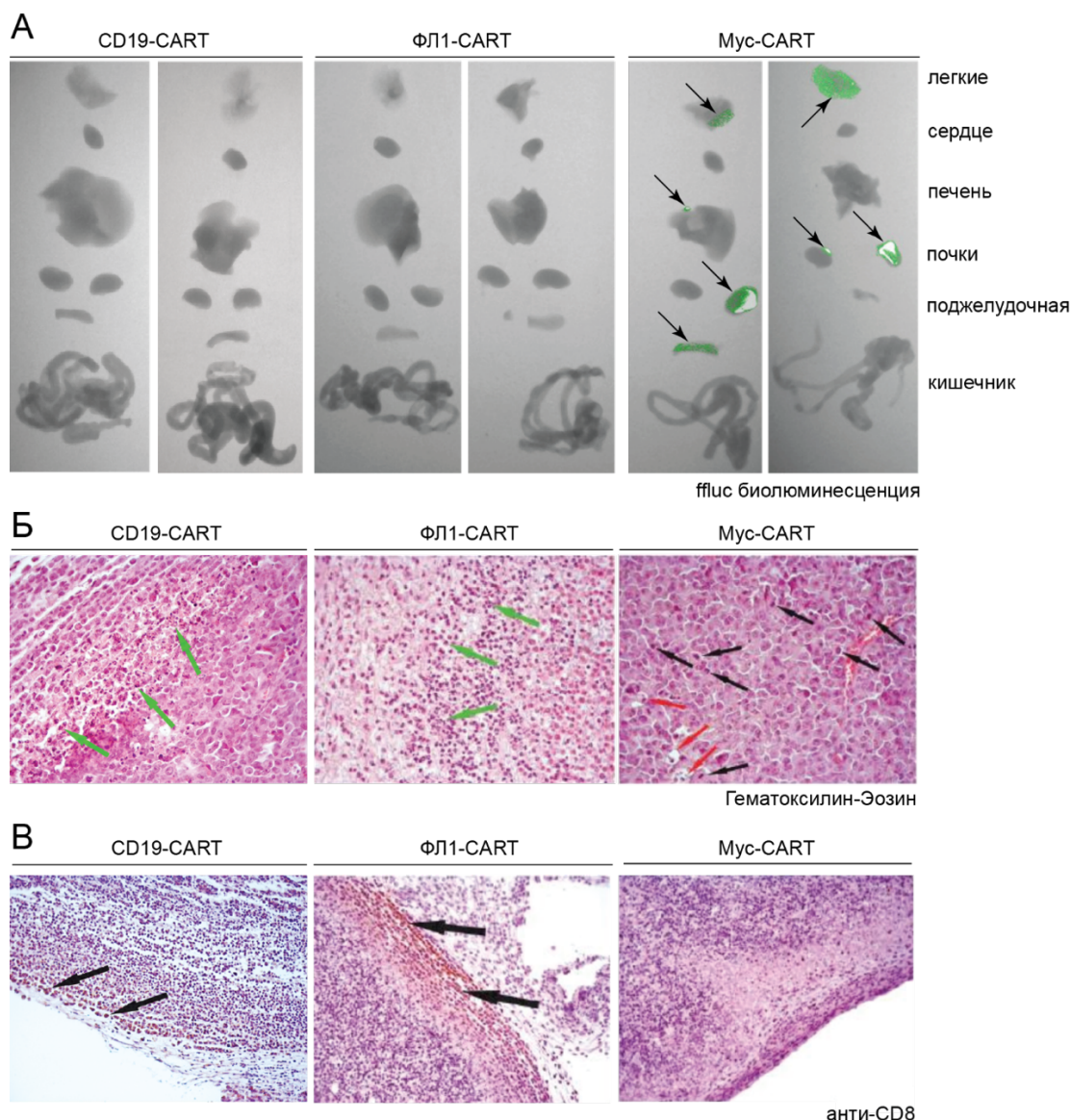


Рисунок 4.8 ФЛ1-CAR Т проникают в солидные опухоли и предотвращают метастазирование ксенотрансплантата. А) Биолюминесцентная визуализация органов мышей, в которые попадают клетки Raji-ФЛ1 (обозначено черными стрелками), на 35-й день после имплантации опухоли. Для обнаружения клеток Raji-ФЛ1 мышам внутрибрюшинно вводили D-люциферин. Б) Анализ гистопатологических изменений в опухолях у животных, которым вводили CAR19, ФЛ1-CAR, или Мус-CAR Т клетки. Для выявления гистологических изменений опухоли окрашивали гематоксилин-эозином. В-клетки лимфомы с базофильной цитоплазмой и высокой скоростью митоза обозначены черными стрелками. Макрофаги, содержащие клеточные остатки, обозначены красными стрелками. Клетки, предположительно находящиеся в состоянии апоптоза, обозначены зелеными стрелками. В) Иммуногистохимический анализ инфильтрующей опухоль CD8 Т клеток (обозначено черными стрелками).

Таким образом, аутокринный метод селекции позволяет отбирать направляющие циклопептиды для персонализированной CAR T 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.

Безусловно, применение CAR19 T клеток является более удобным и стандартизированным подходом, который может быть эффективным для большинства пациентов. Стоит отметить, что терапия CAR19 T клетками вызывает элиминацию не только опухолевых, но и здоровых В-лимфоцитов, что у 70-80% пациентов приводит к длительной В-лимфопении и гипогаммаглобулинемии, увеличивая риск инфекций. Для профилактики используют внутривенный иммуноглобулин (IVIg), а также требуют строгих условий содержания и поддерживающей терапии, что повышает стоимость и риски. Рецидивы опухоли возникают у 30-60% пациентов в течение двух лет, особенно при тяжелой В-лимфопении или низкой экспрессии CD19. Значительная часть рецидивов связана с появлением CD19-негативных клеток, составляющих 10-30% случаев. Применение аутокринной селекции может стать решением для данной когорты пациентов. Несмотря на технологическую сложность получения персонифицированных CAR, по сравнению с CAR19, стоимость клеточного продукта CD19- и BCR- специфичных CAR T клеток может оказаться сопоставимой. При высокой стоимости одного введения CAR19 T клеток почти пол миллиона долларов США [333], значительная часть цены обусловлена коммерческими интересами компаний, для компенсации значительных расходов, связанных с разработкой, клиническими испытаниями, лицензированием и патентной защитой.

По результатам выполненной работы была опубликована статья в журнале Science Advances [334], а также успешно защищена кандидатская диссертация Калинина Романа Сергеевича, в которой автор диссертации выступал в качестве научного руководителя [335].

4.1.2 Отбор антител, специфичных к T клеточному рецептору, для персонализированной CAR терапии T-клеточных лимфом

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 нами был выбран участок CDR3 Т клеточного рецептора (TCR) и фаговый дисплей библиотеки одноцепочечных антител человека для создания CAR специфичных к рецепторам опухолевых Т лимфоцитов (**Рис. 4.9**).

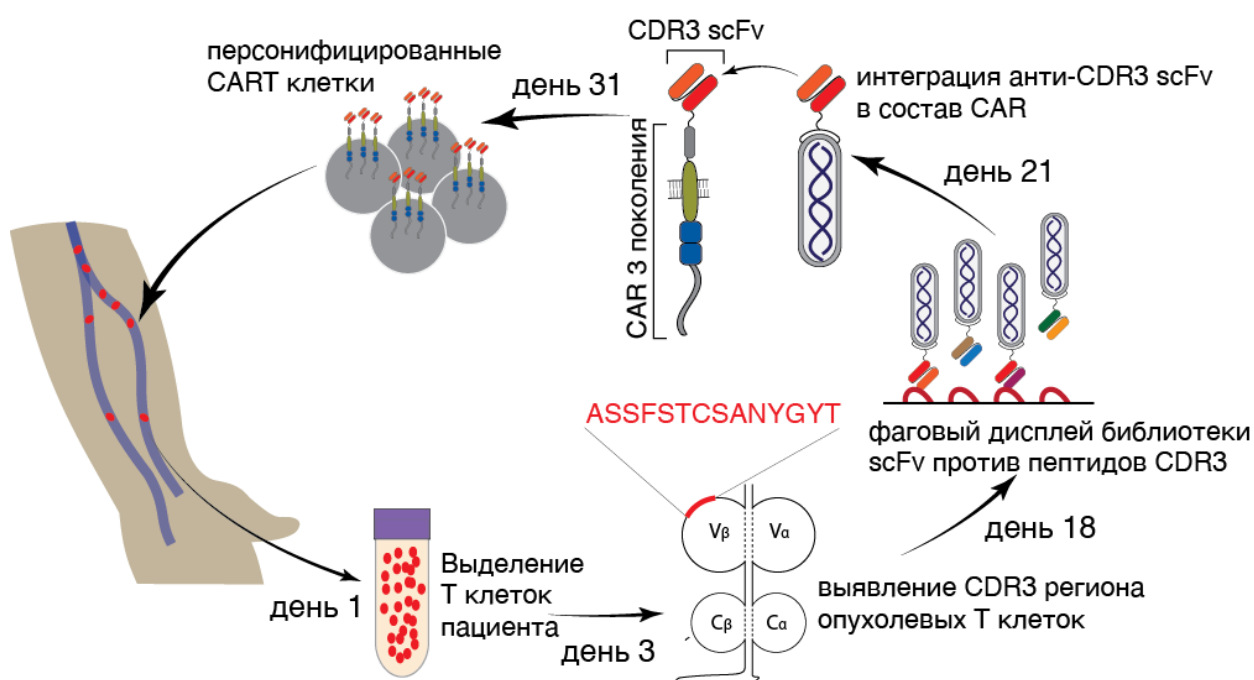


Рисунок 4.9 Схема разработанного подхода получения CAR T клеток, специфичных к опухолевым Т-клеточным рецепторам, для терапии лимфомы и лейкемии.

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 (**Рис. 4.10**).

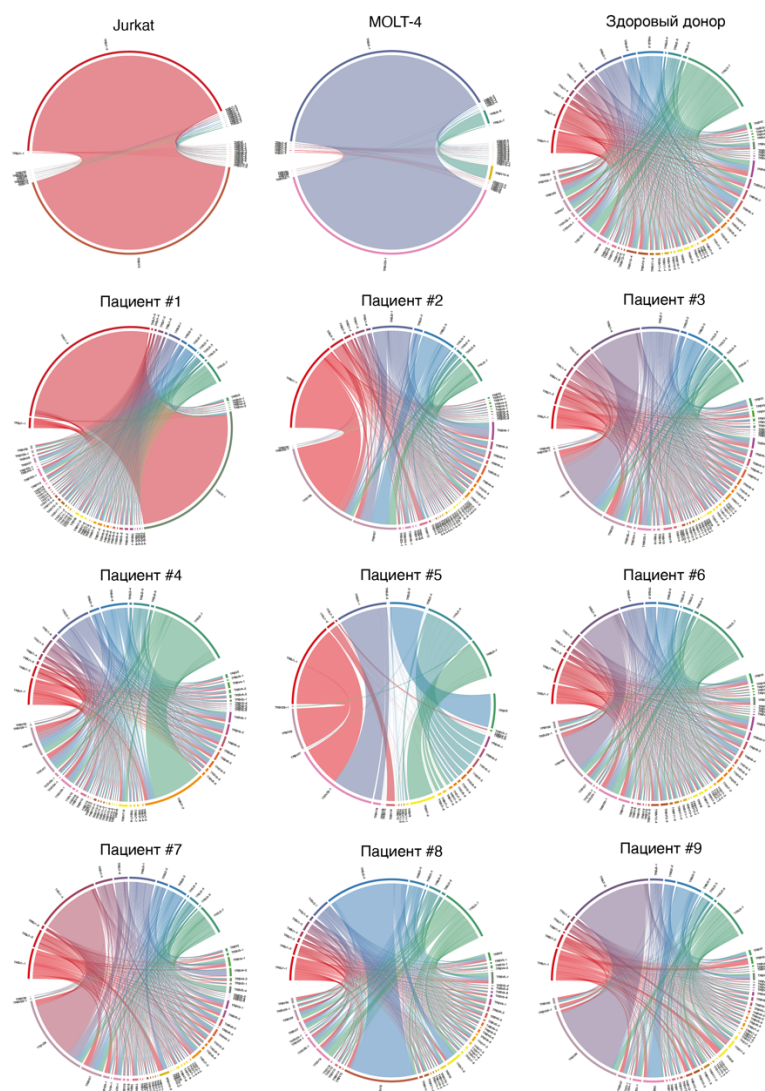


Рисунок 4.10 NGS анализ последовательностей участков CDR3 Т клеточных рецепторов, изолированных из клеток MOLT-4 и Jurkat, здорового донора, а также девяти пациентов с подтвержденным диагнозом Т клеточная лейкемия или лимфома.

Обнаруженные последовательности CDR3 трех пациентов (пациенты #1, #6 и #8) были синтезированы в виде пептидов и использованы для поиска scFv, специфичных к данным последовательностям методом фагового дисплея. После трех раундов селекции были получены scFv, специфичные к CDR3 TCR пациентов #1, #6 и #8 (**Рис. 4.11**).

Sample name	Тип заболевания	CDR3 aa seq	Отобранные антитела	
			Последовательность VL	Последовательность VH
Пациент 1	T-ALL	ASSFEANYGYT	ELVMTQSPATLSLSPGERATL SCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDTSNRATGIPARF SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRKYKWLFGGGTKLE IK	QITLKESGAEVKKPGSSVKVSCAS GDSLNNYVMSWVRQAPGQGFWM GRITPALNETTAAQKFQGRVSFTAD QSTNTAYMELGSLRSEDTAIYYCAK EYRNVYNDAFDSWGQGTMOVIVSS
			ELTLTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQQRPG QAPRLLVYDASTRATGTSAR FSGSGSGTEFTLTISLRSSEDS AVYYCQYQYNKFPPLYTFGQG TKLEIK	EVQLVESGPGVLVKPSETLSLTCTVSG GTFEGYYWSWIRQPPGRGLEWIGY VFYSGTTNYTPSLRSRVTISLDTSKN QISLKLTSVTATDTAIYYCARGMTPR RGWYPLIYFDDWGQALVTVSS
Пациент 6	PTCL	ASTRGQGVNEQY	ELVLTQPPSVSVSPGQTATLT CSGLGLEDKYVCWFQKPG QAPALIIYQDKKRPSGIPERFS GSNSGNTATLTITRVEAGDEA DYVCQVWEVIIDQVFGGGT QLTVL	QITLKESGPTLVKPTQTLSTCTFSG FSLTTKSVCVAWVRQPPGKAPEWLA LICGDDGKRYSPSLKTRLTIAKDISK NQVVLMTNMAPLDTGTGYFCARTG PYRGFERWGPYFYGLDVWGQGSIV TVSS
Пациент 8	AITL	ASSPQGTEA	ELQMTQSPSSLAPVGDITIV TCRADRDIAYNLWVFNHHRPG KTPRLILFEASTLETGVPLRFS GRGSGTDFTLTITSLQPEDVG TYYCQQFYTSYITFGGGTKV EIK	QITLKESGGGVVQPGRLRLSCAAS GFTFKDYTMHWVRQAPGKGLEWL AVISHDGGNKVYADSAKGRFTISR NSKNTLYLHMNLRAGDTAIYYCAK EEWQLWLSYFEHWGQGTLVTVSS

Рисунок 4.11 Последовательности CDR3 пациентов с подтвержденными диагнозами Т клеточная лейкемия или лимфома, а также последовательности переменных фрагментов отобранных фаговым дисплеем антител.

Нуклеотидные последовательности данных 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. 4.12**). 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 (**Рис. 4.13**).

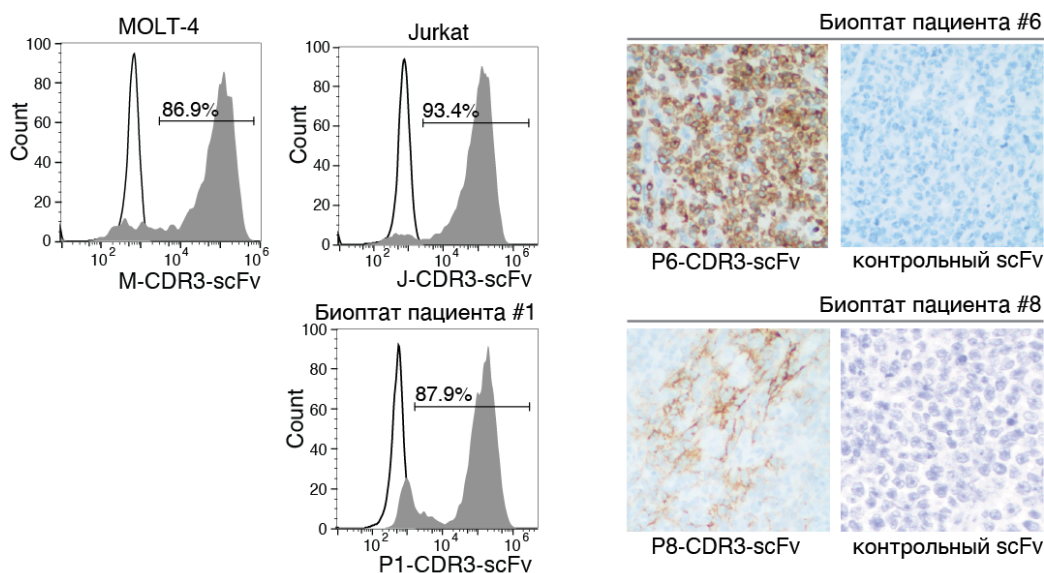


Рисунок 4.12 Окрашивание биоптатов пациентов и клеточных линий scFv, специфичных к участку CDR3 Т клеточного рецептора раковых клеток пациентов #1 (P1-CDR3-scFv), #6 (P6-CDR3-scFv), #8 (P8-CDR3-scFv), а также клеток Jurkat (J-CDR3-scFv) и MOLT-4 (M-CDR3-scFv).

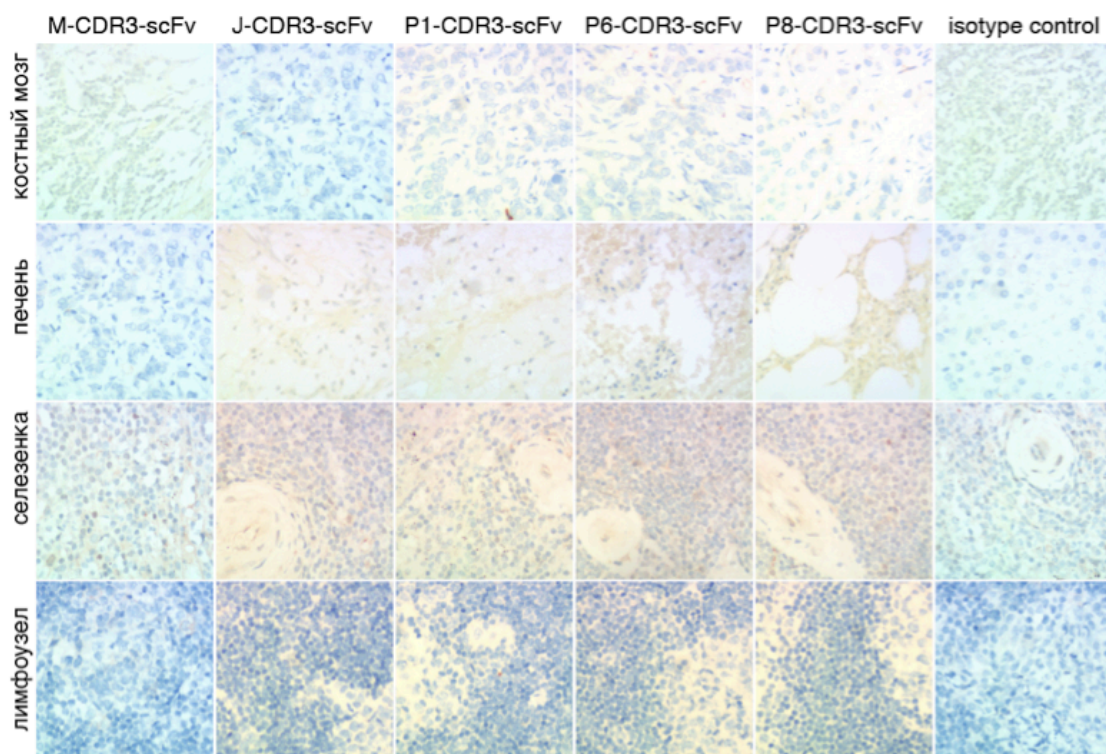


Рисунок 4.13 Гистологический анализ безопасности отобранных scFv по отношению к здоровым тканям. Гистологические срезы печени, костного мозга, селезенки и лимфоузлов были окрашены scFv специфичных к CDR3 участкам опухолевых Т клеток пациентов #1 (P1-CDR3-scFv), #6 (P6-CDR3-scFv), #8 (P8-CDR3-scFv), а 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 из периферической крови человека Т лимфоциты, модифицированные scFv в составе химерных антигенных рецепторов, эффективно элиминировали опухолевые клетки *in vitro* (**Рис. 4.14 А**), а также специфически секретировали провоспалительные цитокины ИНФ гамма (IFN-g) и ИЛ-2. Добавление CAR Т клеток с scFv другой специфичности к этим же клеткам мишеням показало отсутствие неспецифической активности.

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 4.14 Б, добавление к биоптическому материалу CART 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. Для этого иммунодефицитным 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 клеток Jurkat (J-CAR), к TCR клеток MOLT-4 (MOLT-4-CAR), а также к TCR опухолевых клеток пациента #1 (P#1-CAR). Также в каждой экспериментальной группе были животные, которым вводили эквивалентные количества CAR Т клеток, несущих scFv другой специфичности. 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. 4.14 В, Г**). По результатам выполненной работы опубликована статья в журнале *Leukemia* [336].

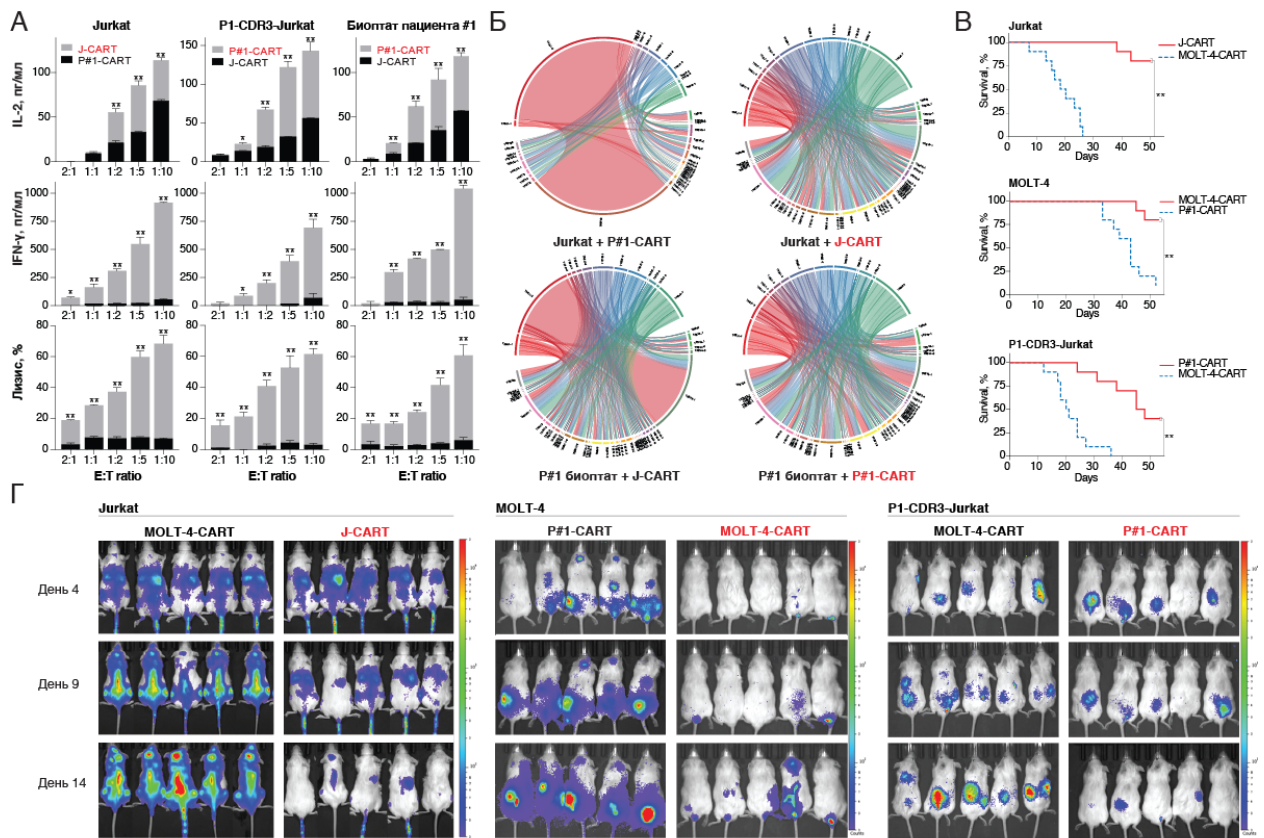


Рисунок 4.14 Анализ функциональной активности CAR T клеток, специфичных к CDR3 участкам Т-клеточного рецептора опухолевых клеток. (А) CDR3-специфичные CAR T клетки эффективно элиминируют опухолевые клетки *in vitro*, а также специфически секретируют провоспалительные цитокины IFN-g и ИЛ-2. Добавление CAR T клеток с scFv другой специфичности к этим же клеткам мишеням показало отсутствие неспецифической активности. (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 T 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 T клеток специфичных к TCR клеток Jurkat (J-CAR), к TCR клеток MOLT-4 (MOLT-4-CAR) и к TCR опухолевых клеток пациента #1 (P#1-CAR)). CDR3-CAR T клетки значительно увеличивают выживаемость в терапевтических группах по сравнению с животными, получившими контрольные CART. (Г) Прижизненная визуализация динамики роста опухолевых клеток в терапевтических и контрольных группах.

4.1.3 Аутокринный отбор антител-агонистов рецептора нейротрофического фактора головного мозга для терапии диабетической ретинопатии

Описанные ранее дисплейные технологии с применением репортерных клеток позволяют не только отбирать лиганды опухолевых клеток, но и получать антитела, которые могут активировать рецепторы клеток, антитела-агонисты. Эффективность данного подхода была подтверждена на примере поиска агонистических антител для терапии повреждений нервов и нейродегенеративных заболеваний.

Нейротрофические факторы играют ключевую роль в формировании нервной системы в процессе развития млекопитающих (1). В нервной системе взрослого человека

были выявлены дополнительные роли этих белковых факторов роста в качестве регуляторов синаптической пластичности и фенотипов нейромедиаторов. К числу таких факторов относятся нейротрофины: фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) и нейротрофины NT3 и NT4. В дополнение к действию на периферические симпатические и сенсорные нейроны BDNF регулирует фенотип нейротрансмиттеров холинергических нейронов базальных отделов переднего мозга. Применение препаратов, обладающих активностью BDNF, вызывает большой интерес для терапии повреждений нервов и нейродегенеративных заболеваний. Добавление BDNF увеличивало выживаемость двигательных нейронов в культуре (8), а также предотвращало атрофию/потерю моторных нейронов лицевого нерва после аксотомии у новорожденных мышей (9). Однако, проведение рандомизированных двойных слепых клинических испытаний III фазы при боковом амиотрофическом склерозе не привело к достижению основных конечных показателей улучшения функции легких и общей выживаемости (10), несмотря на положительную динамику эффективности в небольших исследованиях II фазы. К сожалению, относительно небольшая молекулярная масса белка (27 кДа) и быстрое время выведения, а также высокий суммарный заряд белка осложняют применение BDNF в клинике.

Ранее было показано, что при иммунизации мышей белком эктодомена тропомиозинового тирозинкиназного рецептора B (TrkB) можно выделить антитела, активирующие TrkB (22, 23). В данной диссертационной работе была показана эффективность функционального скрининга комбинаторной библиотеки переменных фрагментов антител человека для поиска агонистических антител рецепторов нейротрофинов для терапии повреждения сетчатки. Для проведения функционального скрининга агонистических антител нами была создана репортерная линия клеток, несущая рецептор нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) TrkB (**Рис. 4.15**).

Для создания репортерных линий клеток клетки HEK293 и CHO трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим ген *NTRK2* под контролем промотора EF1a. Далее клетки HEK293 TrkB трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим бета-лактамазу, под контролем CRE, в то время как клетки CHO были инфицированы несущим ген бета-лактамазы вирусом, причем экспрессия бета-лактамазы была под контролем фактора транскрипции NFAT (**Рис. 4.15 А**). При добавлении лигандов TrkB в репортерных клетках происходит синтез репортерного белка бета-лактамазы, которую можно детектировать, добавляя в среду FRET субстрата, расщепление которого вызывает испускание флуоресцентного сигнала (**Рис. 4.15 Б**).

Анализ эффективности репортерной линии HEK293 TrkB показал дозозависимое увеличение экспрессии бета-лактамазы в ответ на добавление лигандов TrkB (Рис. 4.15 В). В свою очередь, цитофлуориметрический анализ показал, что репортерная линия CHO TrkB активируется в присутствии BDNF, NT3 и NT4, но не NGF (Рис. 4.15 Г). В совокупности, эти результаты показывают, что линии репортеров TrkB демонстрируют высокое соотношение сигнал/шум, необходимое для высокопроизводительного функционального отбора антител.

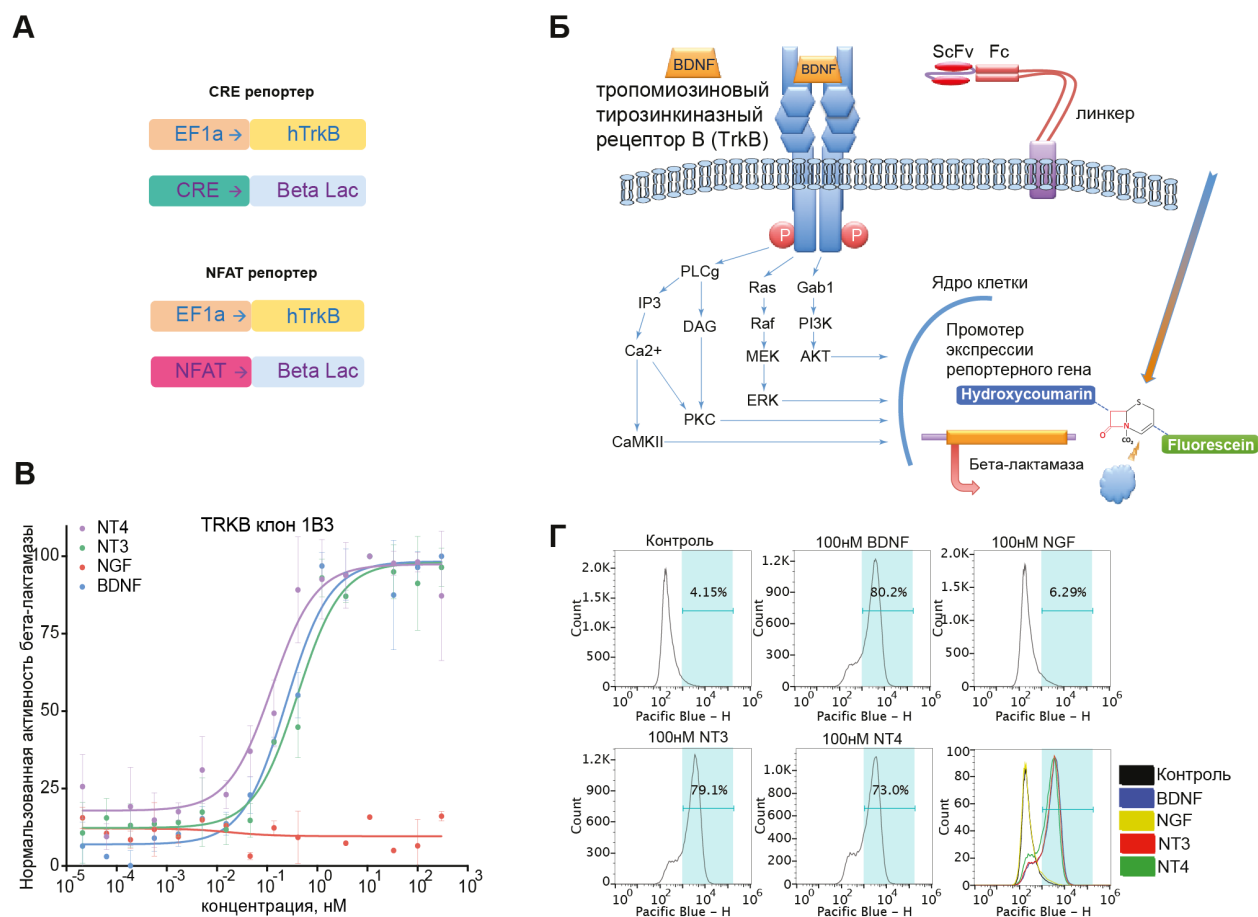


Рисунок 4.15 Создание и характеристика репортерных клеток TrkB. А) Схема лентивирусных конструкций для создания линий репортерных клеток. Б) Иллюстрация механизма работы репортера при его активации. В) Кривые концентрационно-зависимой экспрессии бета-лактамазы при добавлении различных лигандов к линии репортерных клеток TrkB (HEK293 NFAT). Г) Цитофлуориметрический анализ активации репортерной линии CHO TrkB в присутствии BDNF, NT3 и NT4.

Для увеличения эффективности поиска антител-агонистов TrkB с помощью репортерных клеток был проведен один раунд селекции комбинаторной фаговой библиотеки scFv антител человека (представительность библиотеки $>10^{10}$) против рекомбинантного внеклеточного домена TrkB. Полученные в результате фагового дисплея scFv (около 10^6) были клонированы в лентивирусный вектор, который кодирует трансмембранный домен и домен Fc иммуноглобулина (Рис. 4.15 Б). Таким образом, при

экспрессии в отдельных клетках каждый scFv библиотеки заякорен на мембране репортерной клетки. Полученные лентивирусные вектора были использованы для наработки лентивирусной библиотеки трансмембранно-заякоренных антител и трансдукции репортерных клеток CHO-NFAT TrkB. К клеткам добавляли флуоресцентный субстрат бета-лактамазы и отбирали активированные клетки методом сортировки светящихся клеток. После трех раундов отбора было получено 50 клонов антител-агонистов TrkB, из которых 10, наиболее активные и различающиеся по типу клеток-предшественников, были получены в формате полноразмерных антител.

С помощью репортерной линии CHO-NFAT TrkB было обнаружено, что антитела ZEB85 и ZEB30 оказались сравнимы по активности с BDNF, тогда как другие (ZEB44, ZEB27) демонстрировали частичный агонизм с максимальной реакцией (E_{max}), составляющей 10–60% от BDNF (**Рис. 4.16 А**). Цитофлуориметрический анализ подтвердил специфическое связывание антител ZEB30 и ZEB85 клетками, экспрессирующими TrkB (**Рис. 4.16 Б**).

Последовательность BDNF идентична у всех млекопитающих, однако во внеклеточном домене TrkB млекопитающих выявлены незначительные межвидовые различия. Для изучения эффективности ZEB85 был проведен сравнительный анализ активности антитела-агониста по сравнению с BDNF на нейронах грызунов. Поэтому мы изучили влияние ZEB85 на фосфорилирование TrkB в культурах корковых нейронов мыши и его эффект на аксотомизированные взрослые ретинальные ганглиозные клетки (RGC) мыши в эксплантах. ZEB85 стимулировал фосфорилирование TrkB в культурах корковых нейронов мыши, хотя и с меньшей эффективностью по сравнению с BDNF (**Рис. 4.16 В**). Чтобы сравнить способность антител к TrkB стимулировать рост дендритов, экспланты ретинальных клеток взрослой мыши культивировали в присутствии BDNF, ZEB85 или ZEB44 (**Рис. 4.16 Г, Д**). Количественная оценка плотности ветвлений в клетках по методу Шолла показала значительное увеличение числа пересечений дендритов, площади под кривой (AUC) и общей длины дендритов при использовании BDNF (100 нг/мл) и ZEB85 (50 мкг/мл). В свою очередь, антитело ZEB44 вызвало умеренное, но статистически значимое увеличение числа пересечений дендритов, что коррелирует с данными, полученными в репортерной клеточной системе.

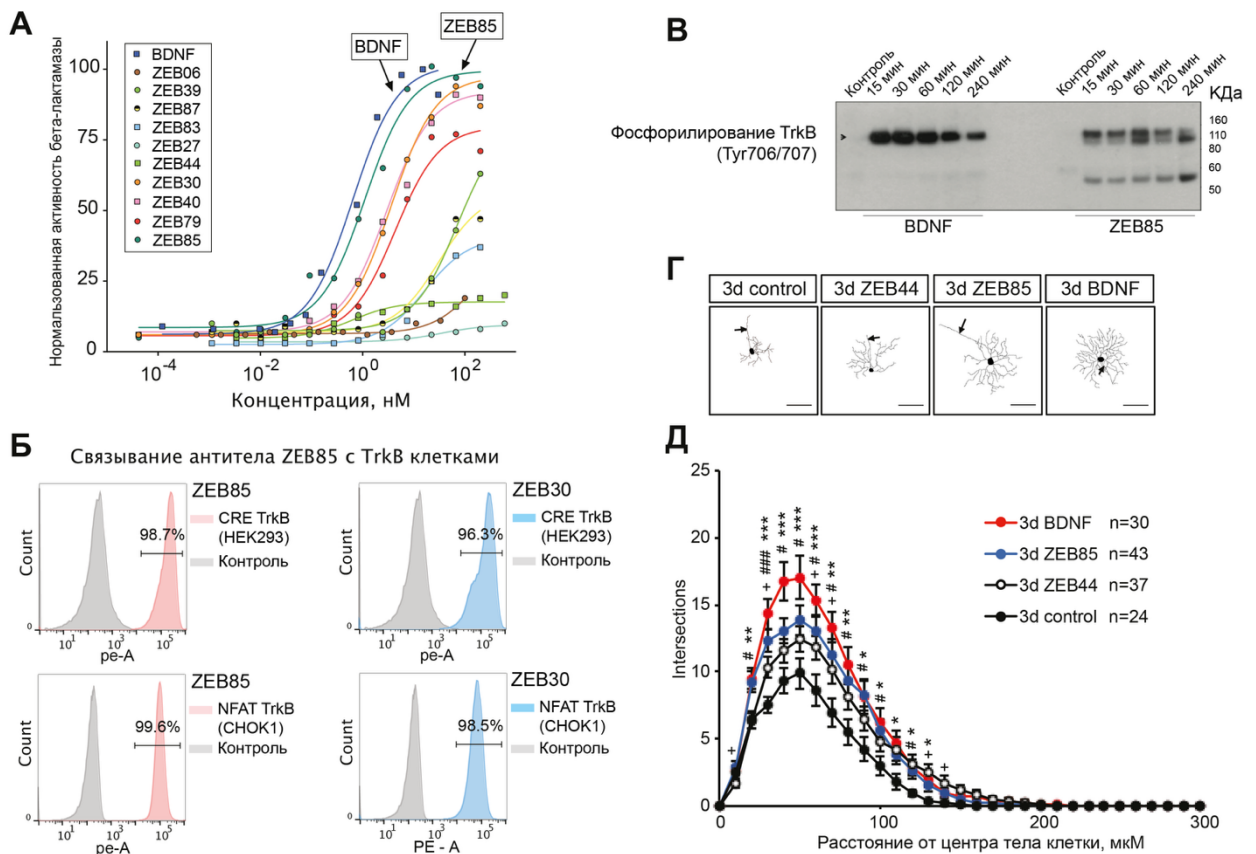


Рисунок 4.16 Анализ функциональной активности отобранных антител агонистов TrkB. А) Анализ активации репортерных клеток TrkB в зависимости от концентрации 10 отобранных антител. Б) Связывание антитела ZEB85 с поверхностью клеток-репортеров TrkB. В) Вестерн-блот анализ фосфорилирования TrkB в культурах корковых нейронов мыши после добавления BDNF (слева) и ZEB85 (справа). Нейроны, взятые на 21-й день эмбрионального развития, культивировали в течение 7 дней. В течение 15–240 минут к культурам добавляли BDNF (100 нг/мл) или ZEB85 (50 мкг/мл), после чего клетки собирали и анализировали на наличие фосфорилированного TrkB. Г) Добавление антител агонистов ZEB44 и ZEB80 стимулируют рост дендритов ретинальных клеток. Анализ поля дендритов в эксплантах сетчатки после 3-дневного лечения ZEB44, ZEB85, BDNF или контрольным раствором. Нейроны окрашивали с помощью DiI/DiO (DiOlistics). Масштаб: 100 мкм. Д) Анализ дендритных полей из Г) по методу Шолла.

В результате функционального клеточного скрининга были обнаружены антитела, являющиеся специфическими агонистами TrkB. Одно из отобранных антител (клон ZEB85) оказалось настолько же эффективным, как и BDNF в отношении стимуляции культуры нейронов человека. Сам BDNF не может быть настолько же эффективным как ZEB85 при клиническом применении, так как это сильно заряженная, гидрофобная молекула с низкой молекулярной массой, которая быстро выводится из организма пациента. На данный момент антитело ZEB85 находится на первой фазе клинических испытаний для терапии диабетической ретинопатии. По результатам выполненной работы была опубликована статья в журнале *PNAS* [337].

Накопленный опыт получения библиотек иммуноглобулинов, проведения отборов и экспрессии антител, а также технология реконструкции природного репертуара антител

человека позволила получить высокоэффективные нейтрализующие антитела человека, предотвращающие заражение вирусом SARS CoV-2 (Guo, et al., Nat. Commun., 2021). Методами рентгеноструктурного анализа показано, что одно из полученных антител (антитело P4A1) связывается с RBD доменом белка S вируса. Антитело P4A1 обладает высокой связывающей и нейтрализующей активностью против SARS-CoV-2 дикого типа и его мутантных форм. В экспериментах, проведенных на макаках-резусах, установлено, что однократное введение P4A1 приводит к нейтрализации SARS-CoV-2. Данная технология была использована для детального анализа репертуара SARS CoV-2-нейтрализующих антител человека после вакцинации инактивированной вакциной SARS-CoV-2 BBIBP-CoV (Sinopharm) (Zhou, et al., Protein Cell, 2021). Полученные данные доказывают, что инактивированные вакцины вызывают формирование нейтрализующих антител широкой специфичности. Применение методов комбинаторной молекулярной биологии позволило на молекулярном уровне изучить механизм действия одной из наиболее применяемых в мире инактивированных вакцин. Подобный подход, использующий микрофлюидику и высокопроизводительный скрининг позволяет по-новому взглянуть на иммунологические репертуары людей, переболевших новой коронавирусной инфекцией и прошедших вакцинацию.

4.2 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 T клетками включает введение пациенту живых клеток с существенным потенциалом к делению и активации, процессы, которые 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 опухоль-ассоциированного антигена на поверхности клеток и лучше дифференцировать опухолевые клетки от здоровых тканей.

4.2.1 *Контроль противоопухолевой активности и специфичности CAR T клеток с помощью органических адаптеров и CAR с каталитической активностью*

На сегодняшний день описан целый ряд белковых молекул-адаптеров для создания модульных CAR, которые подробно описаны в литературном обзоре. С другой стороны, возможность контролировать активность CAR T клеток с помощью низкомолекулярных соединений была доказана только для молекул, конъюгированных с FITC и, соответственно, для CAR, специфичного к FITC. Конъюгат фолата с FITC был способен дозозависимо перенаправлять цитотоксическую активность FITC CAR T клеток против опухолевых клеток, гиперпродуцирующих фолатный рецептор *in vitro* и *in vivo*, а также купировать синдром высвобождения цитокинов после введения большого количества CAR T клеток [338]. С развитием дисплейных технологий, искусственного интеллекта, и методов компьютерного дизайна появляется все больше органических соединений, которые можно использовать для создания низкомолекулярных адаптеров CAR T клеток. Поэтому разработка органических модулей для CAR-переключателей, альтернативных FITC, с возможностью варьирования их размера, функциональности и химических свойств, является важной задачей.

Каталитические антитела (абзимы) 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. В физиологических условиях реактивный остаток лизина (Lys) в составе 38C2 образует обратимую ковалентную связь — энаминон — с узнаваемым 1,3-дикетоном, а также с другими функциональными группами, содержащимися в карбонильных соединениях, таких как β -лактамы [339]. Данное антитело было использовано для создания регулируемых CAR способных катализировать образование ковалентных связей с их субстратами (CovCAR T клетки). Такие CAR T-клетки на основе антитела 38C2, взаимодействующего с 1,3-дикетон-содержащими адаптерами, обладают рядом преимуществ по сравнению с FITC-специфическими CAR. Благодаря ковалентной связи, образуемой между адаптером и 38C2, обеспечивается более стабильная и длительная активация CAR T-клеток в опухоли, особенно при понижении внутриопухолевого pH.

CovCAR T-клетки могут быть ковалентно модифицированы вне опухоли (например, во время циркуляции в крови), где доступна высокая концентрация адаптеров, а затем мигрировать в опухолевые ткани, где концентрация адаптеров значительно ниже. Таким образом, ковалентное декорирование CovCAR T-клеток в кровотоке может обеспечить более широкое терапевтическое окно для введения адаптерных молекул. Важно отметить,

что, антитело 38C2 уже проходило клинические испытания и доказало свою безопасность (NCT00879684, NCT00982657, NCT01441414, NCT00886821, NCT01301456, NCT01637285, NCT00879554, NCT01004822), а широкая модифицируемость адаптеров с 1,3-дикетонной группой позволяет гибко перенастраивать специфичность терапии без необходимости реконструировать сам CAR.

Для создания химерного антигенного рецептора способного формировать ковалентную связь с конъюгатами 1,3-дикетона, то есть, CovCAR, были использованы переменные домены легкой и тяжелой цепи антитела 38C2. Часто, при переводе полноразмерного антитела в формат scFv происходят изменения в ориентации распознающих доменов, которые приводят к изменению аффинности или потере связывания с антигеном. Осуществление каталитической реакции абзимами более чувствительно к трехмерной структуре антитела чем просто связывание антигена. Поэтому, чтобы определить оптимальную конфигурацию каталитического антитела в составе CAR были созданы четыре генетические конструкции, кодирующие scFv 38C2 с разной очередностью переменных доменов легкой V_L и тяжелой V_H цепей, соединённых серин-глициновым линкером, либо линкером Витлоу (Whitlow linker). Остальная часть последовательности CAR включала CH₂ и CH₃ домены Fc фрагмента IgG₄, трансмембранный и внутриклеточный домены CD28, сигнальные домены рецепторов 4-1BB и CD3 ζ (**Рис. 4.17 А**).

Для изучения специфичности и активности CovCAR Т клеток была использована линия клеток плоскоклеточной карциномы KB, которые имеют повышенную экспрессию рецептора фолиевой кислоты (Folate receptor, FR), хорошо окрашиваются антителами к FR и конъюгатом фолиевой кислоты с FITC, а также контрольные клетки A549 (аденокарцинома лёгкого) (**Рис. 4.17 Б, В**). Проточная цитофлуориметрия CovCAR Т клеток показала, что вариант рецептора CovCAR(v4) не появляется на поверхности Т клеток, а CovCAR(v2) наиболее эффективно выходит на поверхность. В свою очередь, только CovCAR(v1) и CovCAR(v2) Т клетки связывали конъюгат 1,3-дикетона с FITC (FITC-дикетон) (**Рис. 4.17 Г, Д**) и экспрессировали маркер ранней активации CD69 в присутствии клеток KB, к которым добавили фолат-дикетон (**Рис. 4.17 В, Д**). Сравнение цитотоксичности CovCAR Т клеток подтвердило данные проточной цитометрии. Т клетки, модифицированные CovCAR(v1) и CovCAR(v2), специфически лизировали клетки KB при добавлении фолат-дикетона (**Рис. 4.17 Е**). Для последующих экспериментов был выбран вариант CovCAR(v2), который далее будет обозначаться как CovCAR.

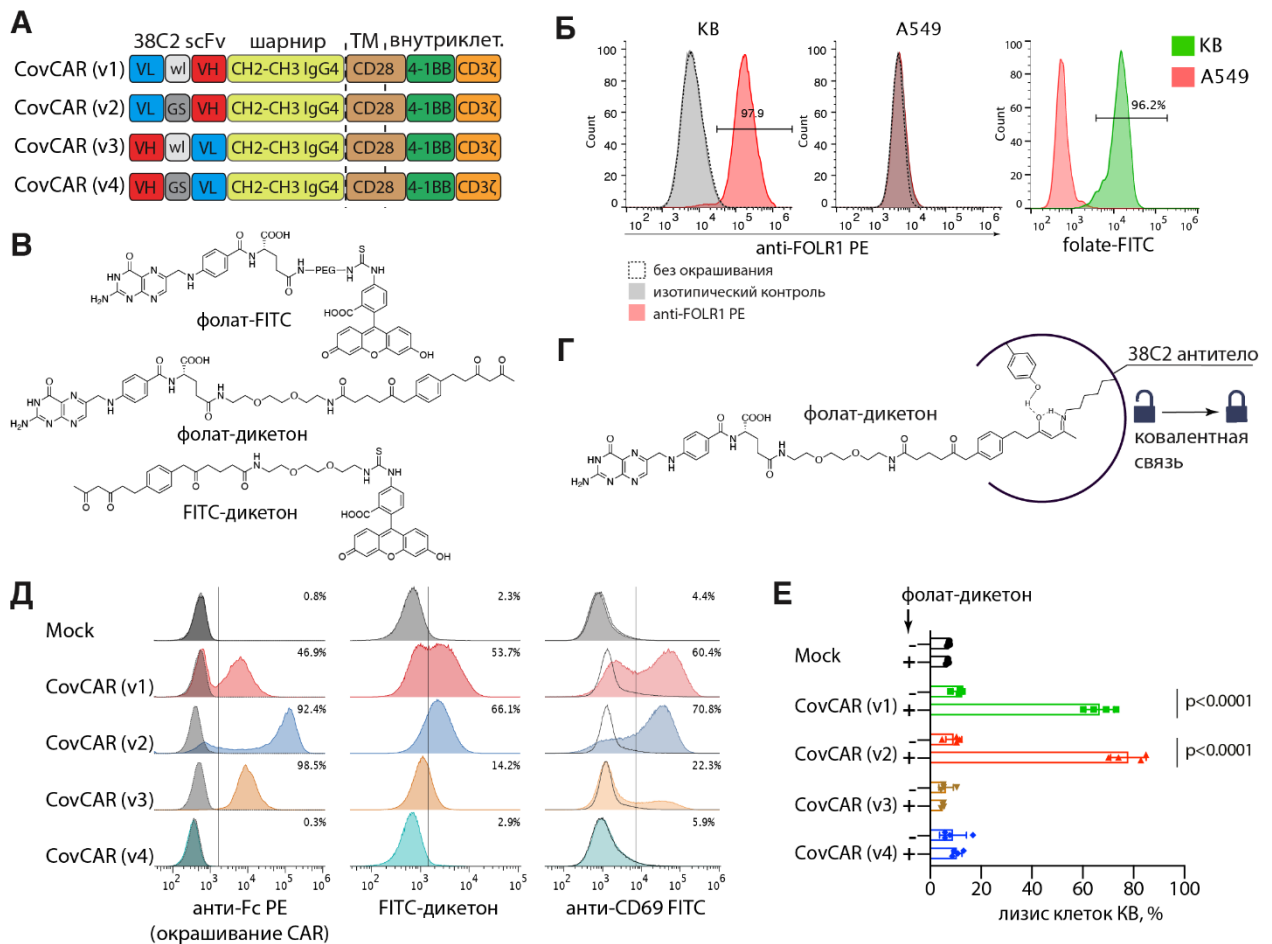


Рисунок 4.17 Создание и характеристика ковалентного CAR Т клеточного рецептора на основе каталитического антитела 38C2. А) Дизайн конструкции ковалентного CAR. ТМ — трансмембранный домен; CD28 — трансмембранный и внутриклеточный сигнальный домен CD28; 4-1BB — внутриклеточный сигнальный домен от CD137; CD3ζ — внутриклеточный сигнальный домен цепи ζ комплекса CD3. Б) Цитофлуориметрический анализ экспрессии фолатного рецептора (FOLR1) 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). Клетки окрашивали антителами против IgG4 (детекция CAR, левый график; серые гистограммы — изотип-контроль) и ФИТС-дикетоном (средний график). Также проведено сравнение экспрессии маркера активации CD69 (правый график) у CovCAR версий v1–v4 после совместной инкубации с клетками KB (24 часа) в присутствии 25 нМ фолат-дикетона (цветные гистограммы) или без адаптера (контурные гистограммы). Е) Сравнение цитотоксичности и неспецифического лизиса, индуцируемого CovCAR v1–v4 по отношению к клеткам KB при добавлении 25 нМ фолат-дикетона или без адаптера. Соотношение CovCAR Т-клеток к клеткам KB составляло 10:1 (n = 4).

Для подтверждения возможности регуляции CAR Т клеток на основе каталитического антитела 38C2 был проведен анализ активации и выброса провоспалительных цитокинов ИЛ-2 и ИНФ гамма CovCAR Т клетками в зависимости от концентрации фолат-дикетона. В экспериментах *in vitro*, показано, что CovCAR Т клетки специфически и дозозависимо от концентрации низкомолекулярного адаптера лизируют клетки KB, но не A549 (Рис. 4.18 А). Иммуноферментный анализ клеточного супернатанта

через 24 часа показал, что CovCAR T клетки секретируют провоспалительные цитокины ИЛ-2 и ИНФ гамма только в присутствии клеток, экспрессирующих рецептор фолиевой кислоты, а интенсивность ответа CAR T клеток коррелирует с концентрацией фолат-дикетона (Рис. 4.18 Б).

Для определения терапевтического потенциала регулируемых CovCAR T клеток, мышам линии NSG (NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJl) подкожно вводили 1 миллион клеток KB, экспрессирующих люциферазу светлячка (KB-FFLuc). Через 3 дня животным вводили 5 млн. CovCAR T клеток внутривенно. Далее животным из экспериментальной группы ежедневно интраперитонеально вводили 1,3-дикетон-фолат в течение 10 дней. Прижизненная визуализация сигнала люциферазы опухолевых клеток KB-FFLuc показала, что уже на 4 день с момента введения CovCAR T клеток и фолат-дикетона происходит полная эрадикация опухоли (Рис. 4.18 В). Измерение объема опухоли показало существенные различия в динамике роста опухолевых клеток (Рис. 4.18 Г). Выживаемость животных из группы, получавших фолат-дикетон значительно превосходит контрольную группу (Рис. 4.18 Д). Результаты экспериментов и последующие данные позволяют предположить, что при более длительном введении фолат-дикетона и переводе животных на специальную диету со сниженным содержанием фолиевой кислоты в корме выживаемость может быть увеличена.

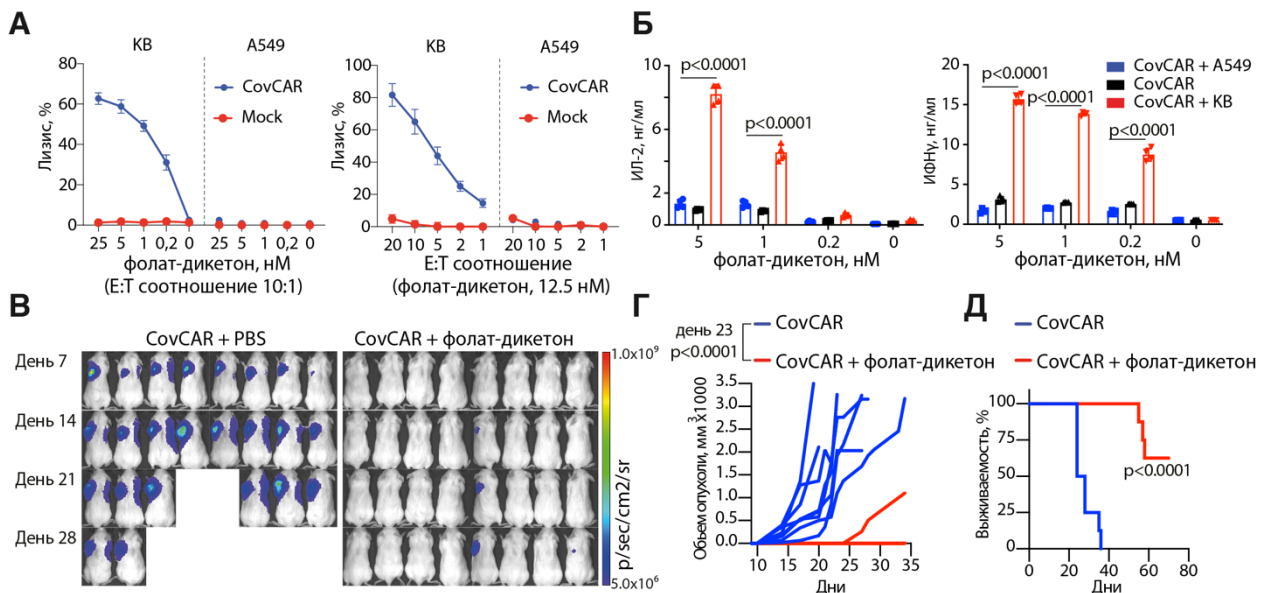


Рисунок 4.18 CovCAR T клетки элиминируют опухолевые клетки в присутствии низкомолекулярного адаптера фолат-дикетона *in vitro* и *in vivo*. А) Влияние концентраций фолат-дикетона на цитотоксическую активность CovCAR T клеток в отношении FOLR1-положительной линии KB контрольной линии A549 (n = 4). Б) Зависимость секреции провоспалительных цитокинов CovCAR T клетками от концентраций фолат-дикетона и наличия опухоль-ассоциированного антигена FOLR1 на клетках мишенях (n = 4). В) Прижизненная

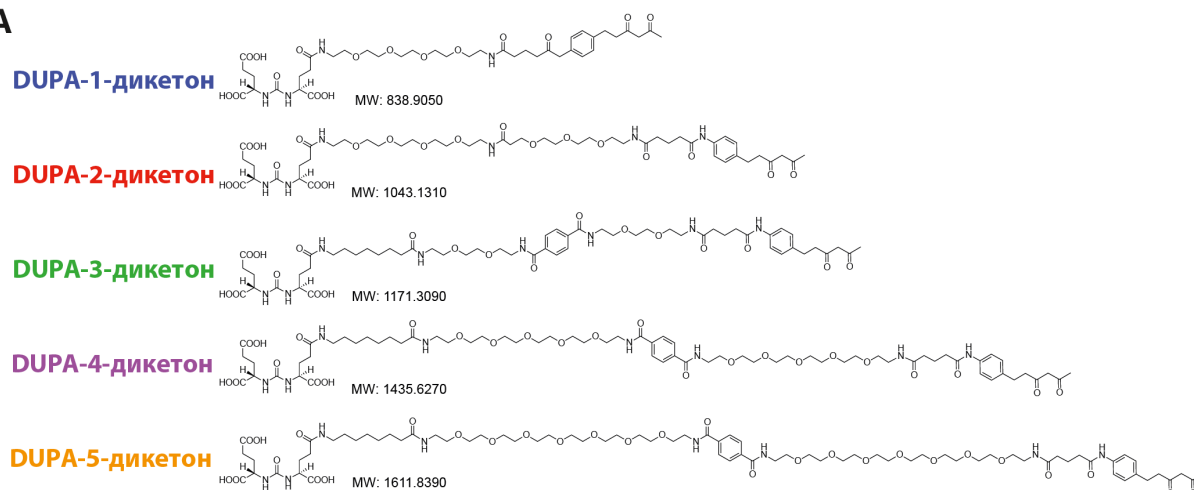
визуализация опухолевых клеток KB-FFLuc у животных, которым вводили CovCAR T клетки в комбинации с PBS или фолат-дикетоном (n=8). Г) Индивидуальные кривые объема опухоли животных из контрольной и экспериментальной групп (n=8). Д) Кривые выживаемости в группах (n=8). $p < 0.0001$ между объемом опухоли в группах PBS и фолат-дикетон на 23-й день; множественные t-тесты. Кривые общей выживаемости построены методом Каплана–Майера и сравнивались с использованием критерия лог-ранга (тест Мантела–Кокса). Для анализа данных на графиках применяли двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой по Тьюки для множественных сравнений. Все данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение (s.d.).

Для расширения потенциальной области применения CovCAR T клеток были получены адаптерные молекулы, направленные на глутаматкарбоксипептидазу II (PSMA). PSMA (простатоспецифический мембранный антиген) – трансмембранный гликопротеин, высоко экспрессируемый на поверхности клеток рака предстательной железы, особенно в его агрессивных и метастатических формах. Благодаря низкой экспрессии в нормальных тканях PSMA считается перспективной опухолевой мишенью для иммунотерапии, включая CAR T-клеточную терапию. Однако, как и в случае с другими солидными опухолями, применение CAR T клеток, специфичных к PSMA, сопряжено с рядом проблем, в том числе, с риском "on-target/off-tumor" токсичности (например, повреждением почек или слюнных желёз). В свою очередь, адаптерные CAR T клетки позволяют контролировать активность CAR T клеток после введения и их чувствительность к плотности антигена на поверхности клеток.

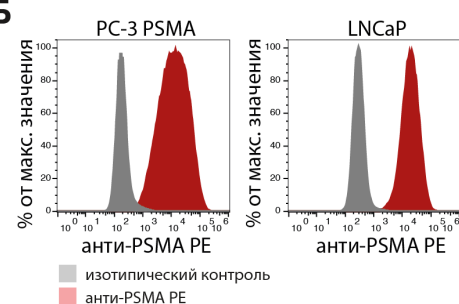
Наиболее известным низкомолекулярным лигандом PSMA является 2-[3-(1,3-дикарбоксипропил)уреидо]пентандиовая кислота (DUPA) — синтетическое соединение с высокой аффинностью к PSMA, широко используемое в качестве модуля для таргетной доставки терапевтических агентов и диагностики. Для оптимизации структуры 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. 4.19 А**). Также нами были получены линии клеток рака простаты PC-3 и карциномы LNCaP с высокой экспрессией PSMA (**Рис. 4.19 Б**). Чтобы выяснить какая структура и длина линкера полученных конъюгатов является оптимальной, CovCAR T клетки были проинкубированы с клетками PC-3 PSMA при различных концентрациях соединений DUPA-n-дикетон. Дальнейший анализ лизиса клеток рака простаты и секреции провоспалительных цитокинов ИЛ-2 и ИНФ гамма показал, что соединение DUPA-1-дикетон, с самым коротким линкером неактивно, а DUPA-2-дикетон слабо индуцирует лизис, не индуцируя выброс цитокинов (**Рис. 4.19 В**). Соединения DUPA-3-дикетон, DUPA-4-дикетон и DUPA-5-дикетон оказались самыми эффективными как для индукции дозозависимого лизиса опухолевых клеток, так и для выброса провоспалительных

цитокинов ИЛ-2 и ИНФ. Аналогичные данные были получены при похожем анализе с использованием клеток линии карциномы LNCaP (Рис. 4.19 Г).

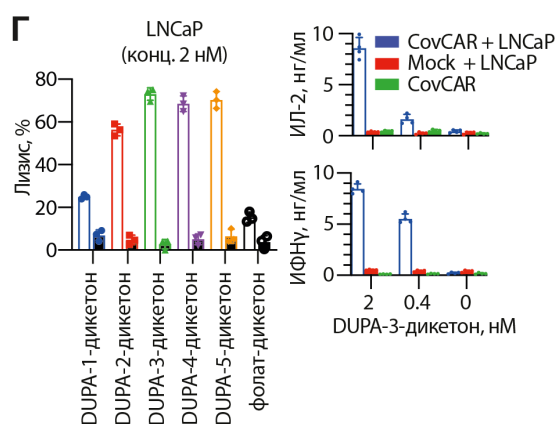
А



Б



Г



В

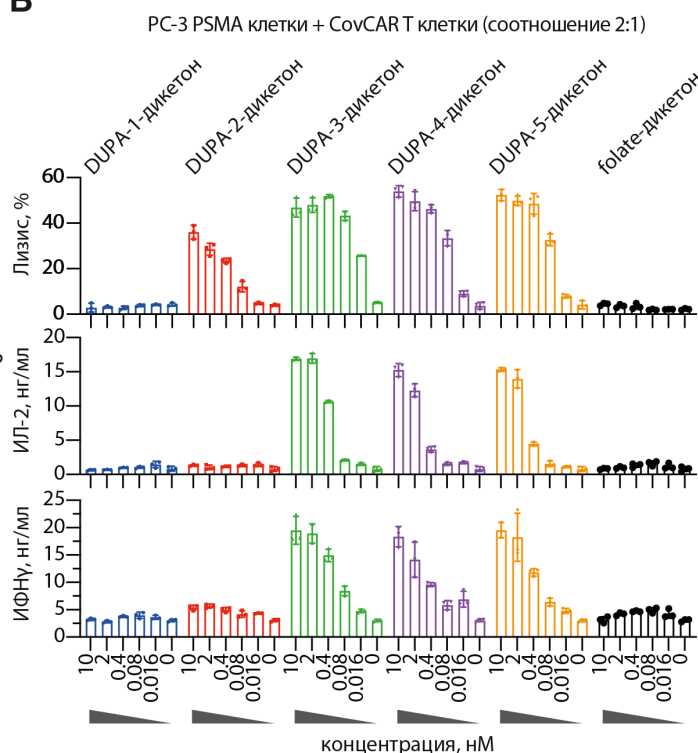


Рисунок 4.19 Синтезированные конъюгаты DUPA и 1,3-дикетона специфичные к PSMA и анализ их функциональной активности. А) Химические структуры панели соединений DUPA с 1,3-дикетонном, содержащие линкеры различного типа и длины. Б) Цитофлуориметрический анализ экспрессии PSMA клетками рака простаты PC-3 и карциномы LNCaP. В) Анализ лизиса клеток рака простаты и выброса провоспалительных цитокинов ИЛ-2 и ИНФ-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 при инкубации 38C2-CART клеток с таргетируемыми клетками LNCaP.

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. 4.20 А). Такая схема терапии является оптимальной и обеспечивает корректную экспансию CAR T клеток [338]. Динамику роста опухоли определяли путем прижизненной визуализации биолуминесценции (IVIS) и измерения объема опухоли животных из всех экспериментальных групп (Рис. 4.20 Б, В, Г). Полученные данные показывают, что совместное введение CovCAR T клеток и соединений DUPA-3-дикетон, DUPA-4-дикетон, а также DUPA-5-дикетон эффективно подавляет рост опухоли или полностью уничтожает раковые клетки. Соединение DUPA-3-дикетон оказалось самым эффективным и его введение привело к 100% выживаемости животных в группе в течение более 50 дней с момента начала терапии CovCAR T и DUPA-3-дикетоном (Рис. 4.20 Д).

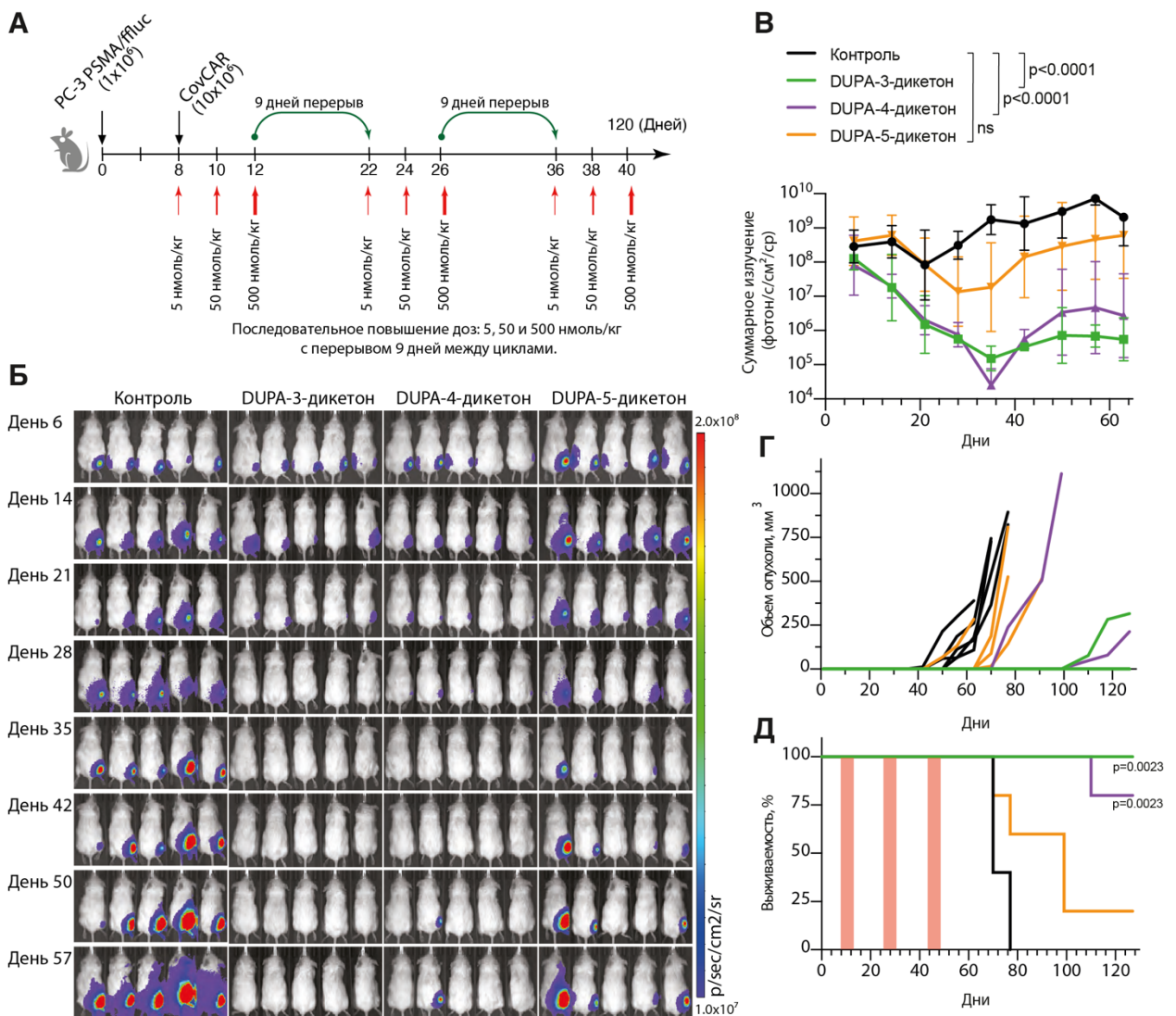


Рисунок 4.20 Анализ противоопухолевой активности CovCAR T клеток при введении соединений DUPA-3-дикетон, DUPA-4- дикетон и DUPA-5- дикетон в ксенотрансплантатной модели рака простаты. А) Схема эксперимента. Мышам линии NSG подкожно имплантировали 1×10^6 клеток PC-3-PSMA/ffluc. На 8-й день после инокуляции опухоли животным из всех экспериментальных групп внутривенно вводили 10×10^6 CovCAR T клеток. Затем мышам вводили внутривенно либо PBS, либо возрастающие дозы конъюгатов DUPA-3-дикетона, DUPA-4-дикетона и DUPA-5-дикетона: 5 нмоль/кг на 8-й день, 50 нмоль/кг на 10-й день и 500 нмоль/кг на 12-й день.

После первого курса терапии животным предоставляли 9-дневный отдых, после чего цикл повторяли. 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) за период с 6 по 57 день (среднее \pm стандартное отклонение). Для статистического анализа использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA); поправки на множественные сравнения рассчитаны по методу Тьюки. Г) Динамика роста опухоли у мышей контрольной и экспериментальных групп. Д) Кривые выживаемости животных из контрольной и экспериментальных групп, построенные по методу Каплана–Майера. Все данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

Далее было подтверждено, что конъюгаты дикетонов позволяют контролировать эффективность и персистенцию CovCAR Т клеток *in vivo* (**Рис. 4.21**). Для отслеживания модифицированных Т клеток после введения животным были получены CAR Т-клетки, ко-экспрессирующие CovCAR и люциферазу (CovCAR/ffluc). Мышам линии NSG подкожно вводили 1×10^6 клеток PC-3 PSMA (не содержащих люциферазу, то есть, опухоль не светилась при введении люциферина). На 12-й день после трансплантации опухоли животным вводили 10×10^6 CovCAR/ffluc Т клеток. Через 6 часов животные начали получать внутривенные инъекции DUPA-3-дикетона: 5 нмоль/кг на 12-й день, 50 нмоль/кг на 14-й день, 500 нмоль/кг на 16-й день, затем 5 нмоль/кг на 29-й день, 50 нмоль/кг на 31-й день и 500 нмоль/кг на 33-й день (**Рис. 4.21 А**). Отслеживание сигнала биoluminesценции люциферазы CovCAR Т клеток на 15, 17, 19, 24, 32 и 38 дни показало, что у животных, получавших DUPA-3-дикетон, CovCAR Т клетки преимущественно локализуются в области опухоли (**Рис. 4.21 Б**). Полученные данные показывают, что пролиферация CovCAR Т клеток коррелирует со введением DUPA-3-дикетона. CAR Т клетки начинали размножаться в середине первого цикла введения малой молекулы, как видно на 15, 17 и 19 дни (**Рис. 4.21 Г**). После прекращения введения препарата сигнал от CovCAR Т клеток существенно снижался к 24 дню. Важно отметить, что возобновление введения DUPA-3-дикетона вновь приводило к накоплению CovCAR Т клеток в сайте опухоли (**Рис. 4.21 Б**). Уровни интерферона- γ и перфорина в сыворотке, измеренные на 16, 21 и 34 дни, также коррелировали с пролиферацией CovCAR Т клеток и введением DUPA-3-дикетона (**Рис. 4.21 В, Г**). Таким образом, полученные данные подтверждают возможность регулировать активность CovCAR Т клеток *in vivo*.

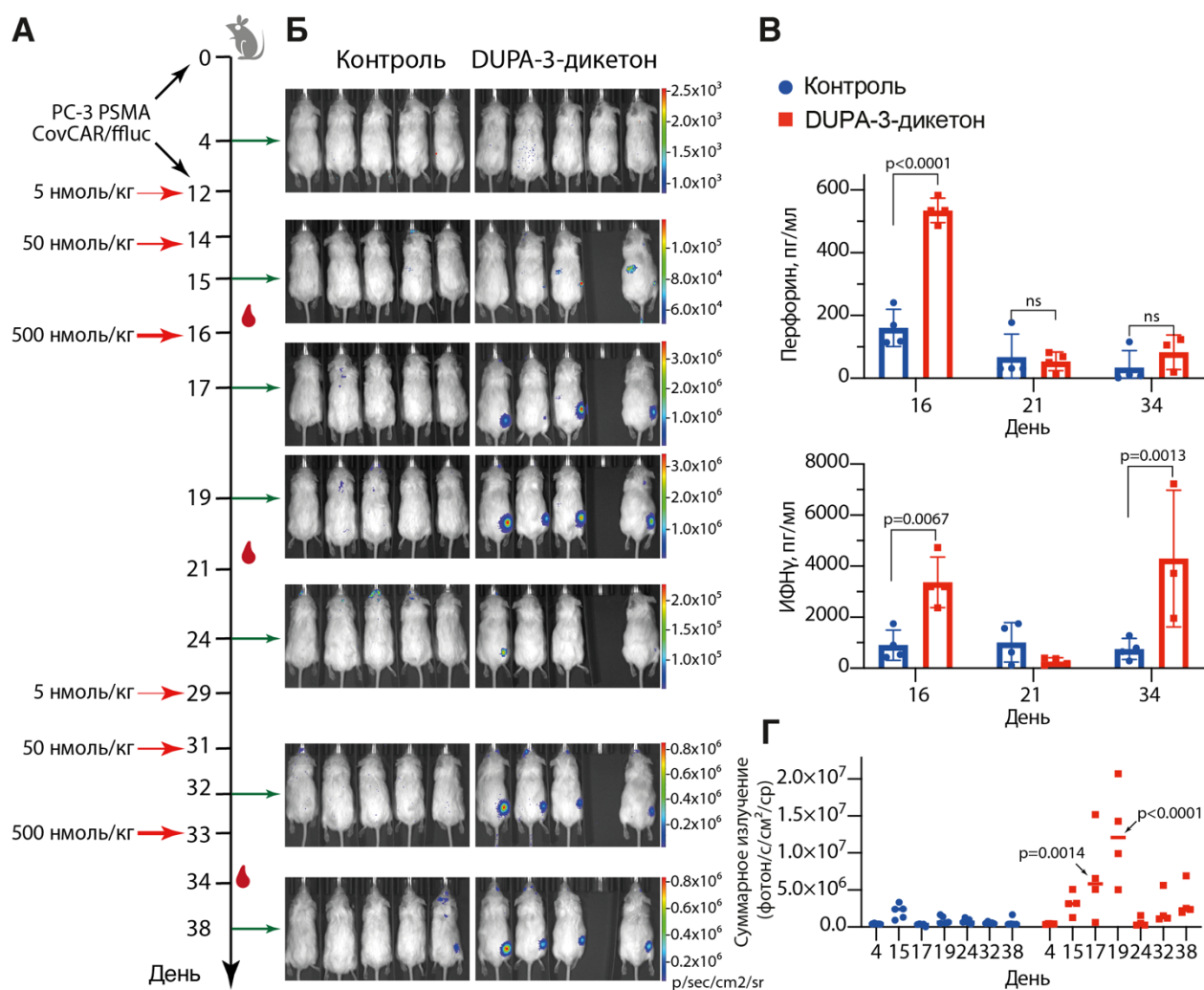


Рисунок 4.21 Контроль активности, пролиферации и персистенции CovCAR T клеток *in vivo*. А) Схема проведения эксперимента. Мышам линии NSG подкожно имплантировали 1×10^6 клеток PC-3 PSMA. На 12-й день после инокуляции опухоли все группы животных получили внутривенно 10×10^6 CovCAR T клеток, экспрессирующих люциферазу (CovCAR/ffluc). Мышам внутривенно вводили PBS, либо DUPA-3-дикетон: 5 нмоль/кг на 12-й день, 50 нмоль/кг на 14-й день, 500 нмоль/кг на 16-й день; затем 5 нмоль/кг на 29-й день, 50 нмоль/кг на 31-й день и 500 нмоль/кг на 33-й день. Б) Прижизненная визуализация CovCAR/ffluc T клеток. В) Концентрации интерферона- γ (ИНФ γ) и перфорина в периферической крови на 16, 31 и 34 дни ($n = 4$). Значения p определяли, используя множественный t-тест. Г) Количественный анализ биolumинесценции CovCAR T клеток в животных. Значения p рассчитывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Шидека на множественные сравнения. Все данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение (s.d.).

4.2.2 Поиск новых органических лигандов опухолевых антигенов с помощью ДНК-кодированных библиотек химических соединений (DEL) для создания адаптеров CovCAR T клеток.

Приведенные выше данные показывают, что при наличии лигандов (таких как фолат или DUPA) можно создать низкомолекулярный адаптер для направления и контроля активности CovCAR T клеток. Регулируемые CAR T клетки показали свою эффективность как *in vitro*, так и *in vivo* в отношении разных рецепторов и типов раковых клеток. К

сожалению, выбор таких соединений очень ограничен. С другой стороны, классический способ поиска новых лигандов, специфически связывающихся с опухолевыми маркерами, заключается в скрининге больших библиотек химических соединений с помощью роботизированных систем. Данный процесс требует большого количества ресурсов и времени, а также подбора метода скрининга. Альтернативой такому подходу, стало использование ДНК-кодированных библиотек химических соединений, которые все активнее используются в лабораторных и биофармацевтических целях. Идея ДНК-кодированных библиотек (DNA-Encoded Libraries, DEL) была впервые предложена в 1992 году американским химиком Ричардом Лернером (Richard A. Lerner) и его коллегой Сиднеем Бреннером (Sydney Brenner) — нобелевским лауреатом, одним из основоположников современной молекулярной биологии [340]. В своей статье (PNAS, 1992) они предложили концепцию, предлагающую конъюгировать каждое химическое соединение с уникальной последовательностью ДНК, которая штрих-кодирует, то есть однозначно соответствует его химической структуре. 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. Эта идея легла в основу целого направления в химической биологии и стала базой для платформ поиска новых соединений, таких как WuXi DEL, X-Chem, HitGen и других.

Поиск новых соединений для CovCAR был проведен совместно с сотрудниками компании WuXi (**Рис. 4.22**). ДНК-кодированные библиотеки (DEL) компании WuXi состоят из более чем 50 миллиардов соединений, каждое из которых ковалентно связано с уникальной ДНК-меткой, служащей молекулярным штрихкодом. Данные библиотеки могут быть использованы для скрининга лигандов методом аффинной селекции: смесь соединений библиотеки инкубируется с мишенью (например, белком), после чего не связавшиеся молекулы отмываются, а связавшиеся идентифицируют путём высокопроизводительного секвенирования прикреплённой ДНК. Такой подход позволяет эффективно отбирать лиганды к мишеням в одной реакции, без необходимости физического разделения каждого соединения (множества планшетов с индивидуальными соединениями в каждой лунке). Отобранное соединение можно конъюгировать с 1,3-дикетоном и использовать в качестве низкомолекулярных адаптеров, направляющих активность CovCAR T клеток.

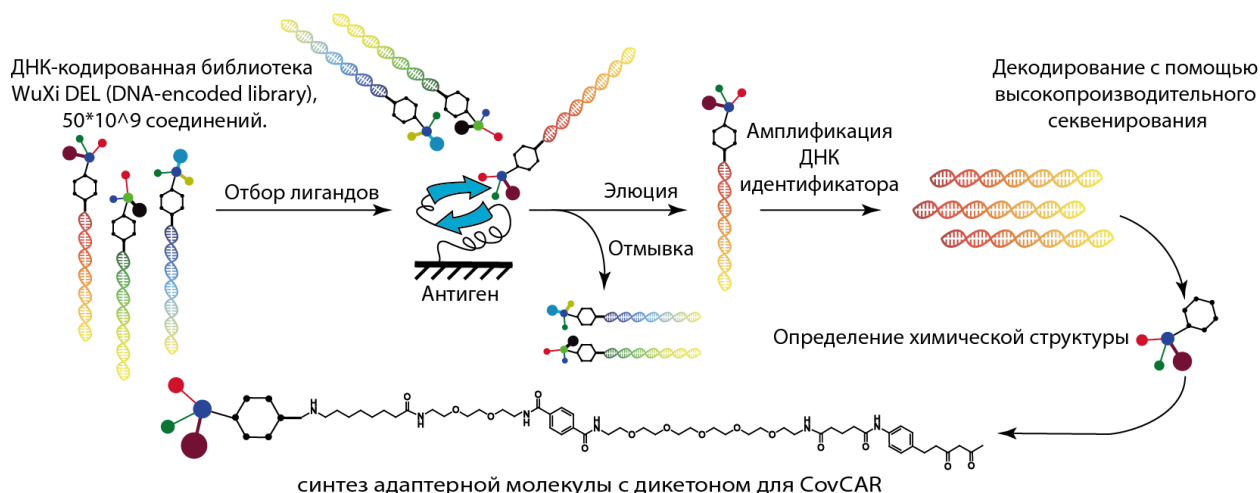


Рисунок 4.22 Поиск новых низкомолекулярных соединений аффинных к рецепторам опухолевых клеток с помощью скрининга ДНК-кодируемых библиотек химических соединений (DNA-encoded libraries, DEL).

Для поиска новых лигандов, специфически связывающихся с опухоль-ассоциированными антигенами PSMA (Рис. 4.23) и HER2 (Рис. 4.24) был проведен отбор соединений из библиотеки WuXi DEL. Для скрининга были использованы четыре разных библиотеки соединений – WuXi-DEL-Lib1, WuXi-DEL-Lib2, WuXi-DEL-Lib3 и WuXi-DEL-Lib4. Различия между данными библиотеками заключаются в использовании различных “строительных блоков” (building block: BB1, BB2 и BB3) из которых собирается соединение при синтезе. В результате отбора было выявлено несколько групп соединений с типичными профилями обогащения (Рис. 4.23 А и Рис. 4.24 А). Соединения с наибольшим числом копий из каждой химически родственной группы были синтезированы и протестированы. Важно отметить, что наличие конъюгированной ДНК может значительно повысить растворимость соединения библиотеки DEL. С одной стороны, это позволяет получить как можно больше потенциально функциональных молекул, которые можно использовать как отправную точку для дальнейшего улучшения, используя подходы рационального дизайна. С другой стороны, некоторые соединения оказываются нерастворимыми в водных растворах без ДНК-баркода, что ограничивает выбор.

В результате проведения отбора высокопроизводительное секвенирование ДНК идентифицировало девять соединений потенциально специфичных к PSMA и шесть соединений специфичных к HER2. Каждое из отобранных органических соединений было синтезировано и проанализировано на связывание с опухолевыми антигенами. Поверхностный плазмонный резонанс (SPR, Biacore S200) показал, что новые соединения взаимодействуют с рекомбинантным PSMA в наномолярном диапазоне (Рис. 4.23 Б). В свою очередь, из-за образования комплексов буфером для проведения анализа не удалось определить константы взаимодействия соединений, отобранных против HER2.

Для направления активности CovCAR T клеток в состав отобранных органических соединений был добавлен линкер и 1,3-дикетон (**Рис. 4.23 В, Рис. 4.24 В**). Наиболее эффективной молекулой для адресной элиминации клеток рака простаты, экспрессирующих PSMA оказалось соединений DEL507. Нами был проведен анализ лизиса клеток рака простаты и выброса провоспалительных цитокинов CovCAR T клетками в зависимости от концентрации соединения DEL507-дикетон (три варианта с линкерами разной длины) (**Рис. 4.23 Г**). Как видно из приведенных данных, соединение DEL507-3-дикетон с самым коротким линкером менее активно по сравнению с DEL507-6-дикетон и DEL507-7-дикетон. Они оказались самыми эффективными как для индукции дозозависимого лизиса опухолевых клеток, так и для выброса провоспалительных цитокинов ИЛ-2 и ИНФ (**Рис. 4.23 Д**).

При анализе цитотоксичности CovCAR T клеток в отношении клеток рака молочной железы SK-BR-3, экспрессирующих HER2, и контрольных клеток KB видно, что соединения DEL675/1-4-дикетон и DEL675/9-4-дикетон обладают наибольшей активностью (**Рис. 4.24 Б**). Далее, аналогично DEL507, был проведен анализ лизиса клеток рака молочной железы SK-BR-3 и выброса провоспалительных цитокинов ИЛ-2 и ИНФ CAR T клетками в зависимости от концентрации соединений DEL675/1-4-дикетон и DEL675/9-4-дикетон (**Рис. 4.24 Г, Д**).

Полученные данные показывают возможность поиска новых лигандов опухолеассоциированных антигенов с помощью ДНК-кодированных библиотек химических соединений и создания на их основе низкомолекулярных адаптеров, направляющих и контролирующей активность CovCAR T клеток. По результатам выполненной работы была опубликована статья в журнале Nature Biomedical Engineering [341].

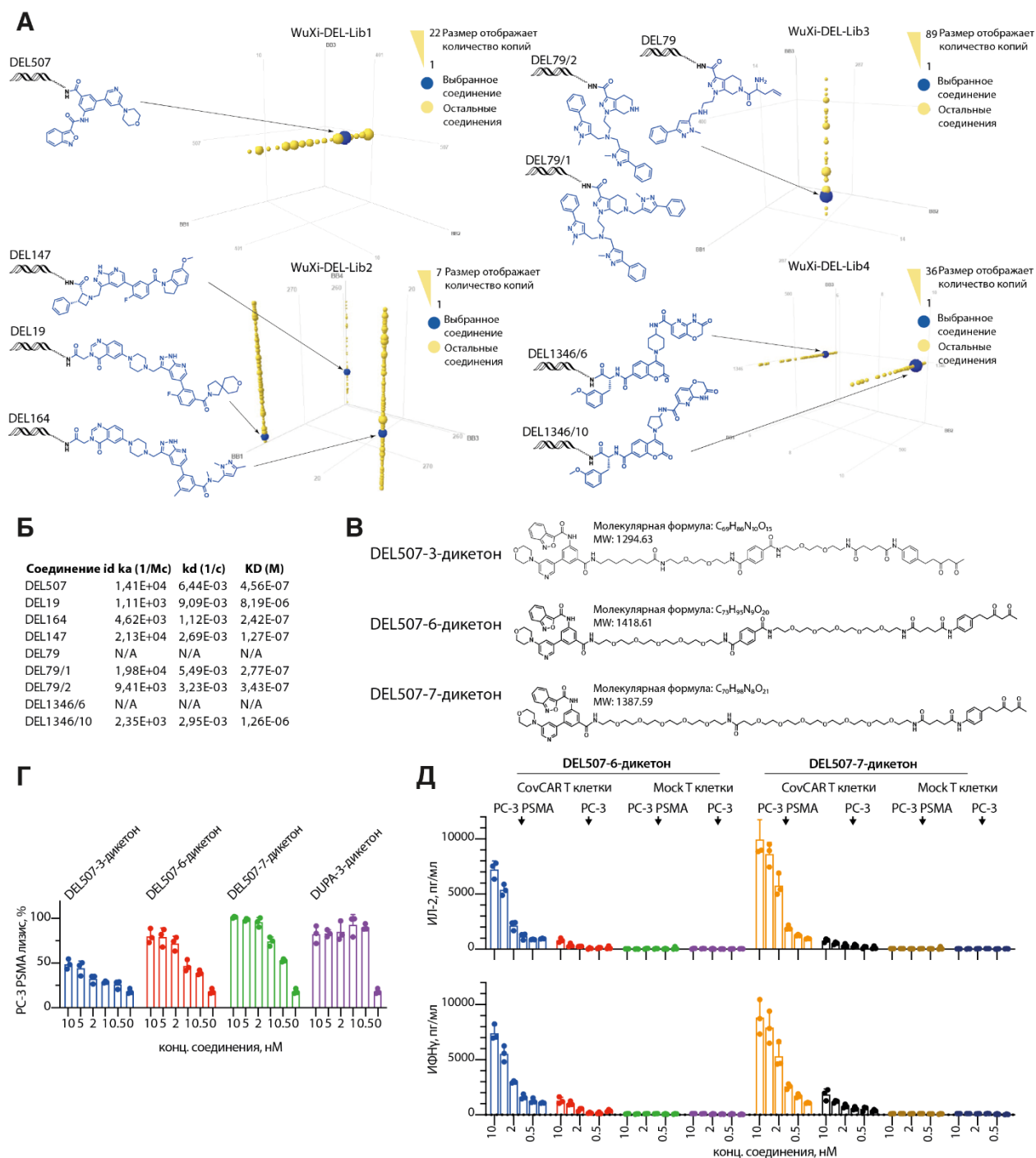


Рисунок 4.23 Скрининг ДНК-кодированной библиотеки химических соединений для поиска лигандов PSMA и создания адаптерных молекул для CovCAR. А) Трёхмерная визуализация результатов отбора. Показаны идентифицированные структуры PSMA-связывающих соединений, отобранных из DEL-библиотек WuXi-DEL-Lib1, WuXi-DEL-Lib2, WuXi-DEL-Lib3 и WuXi-DEL-Lib4. 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 *in vitro*. Соотношение эффекторных Т-клеток к опухолевым клеткам составляло 2:1. Все данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение (s.d.).

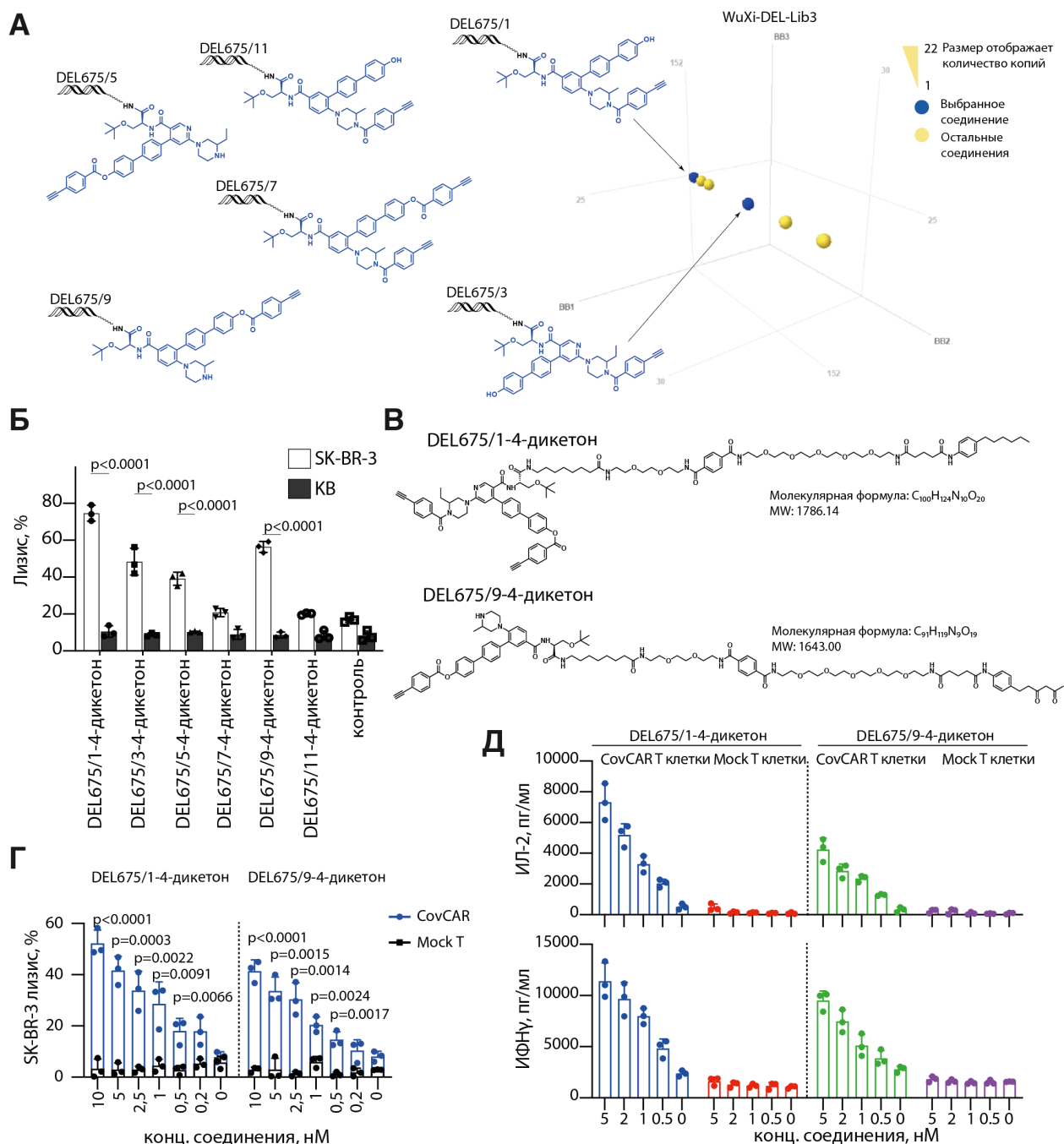


Рисунок 4.24 Скрининг ДНК-кодированной библиотеки химических соединений для поиска лигандов HER2 и создания адаптерных молекул для CovCAR. А) Трёхмерная визуализация результатов отбора. Показаны идентифицированные структуры PSMA-связывающих соединений, отобранных из библиотеки WuXi-DEL-Lib3. Б) HER2-специфические конъюгаты с дикетоном активируют лизис SK-BR-3 клеток в присутствии CovCAR Т и по сравнению с контрольными HER2-негативными клетками KB. Для анализа использовался двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Шидака на множественные сравнения. В) Химические структуры синтезированных DEL675/1-4-дикетон и DEL675/9-4-дикетон соединений, специфических к HER2. Г) Зависимость лизиса SK-BR-3 клетками CovCAR Т клетками от концентраций DEL675/1-4-дикетон и DEL675/9-4-дикетон. Д) Влияние концентраций конъюгатов DEL675/1-4-дикетона и DEL675/9-4-дикетона на секрецию провоспалительных цитокинов цитокинов CovCAR и Mock Т-клетками *in vitro*. Все данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение (SD).

4.2.3 *Контроль противоопухолевой активности и специфичности CAR Т клеток с помощью молекулярной пары барназа – барстар*

Как уже упоминалось во введении, существует большое количество адаптерных CAR на основе белковых молекул. Однако, несмотря на оригинальность предложенных адаптерных молекул, все они (за исключением hmCD16 CAR) сфокусированы на том, какую пару белков использовать в адаптере или CAR. Привлекательной выглядит идея придания адаптерной молекуле дополнительных функций или самостоятельной цитотоксичности для усиления противоопухолевой активности CAR Т клеток. Для создания регулируемых CAR и цитотоксического модуля было предложено использовать молекулярную пару Барназа-Барстар, которые представляют собой уникальный пример молекулярного распознавания с высокой скоростью и сродством [328]. РНКаза-Барназа была использована 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 (**Рис 4.25**).

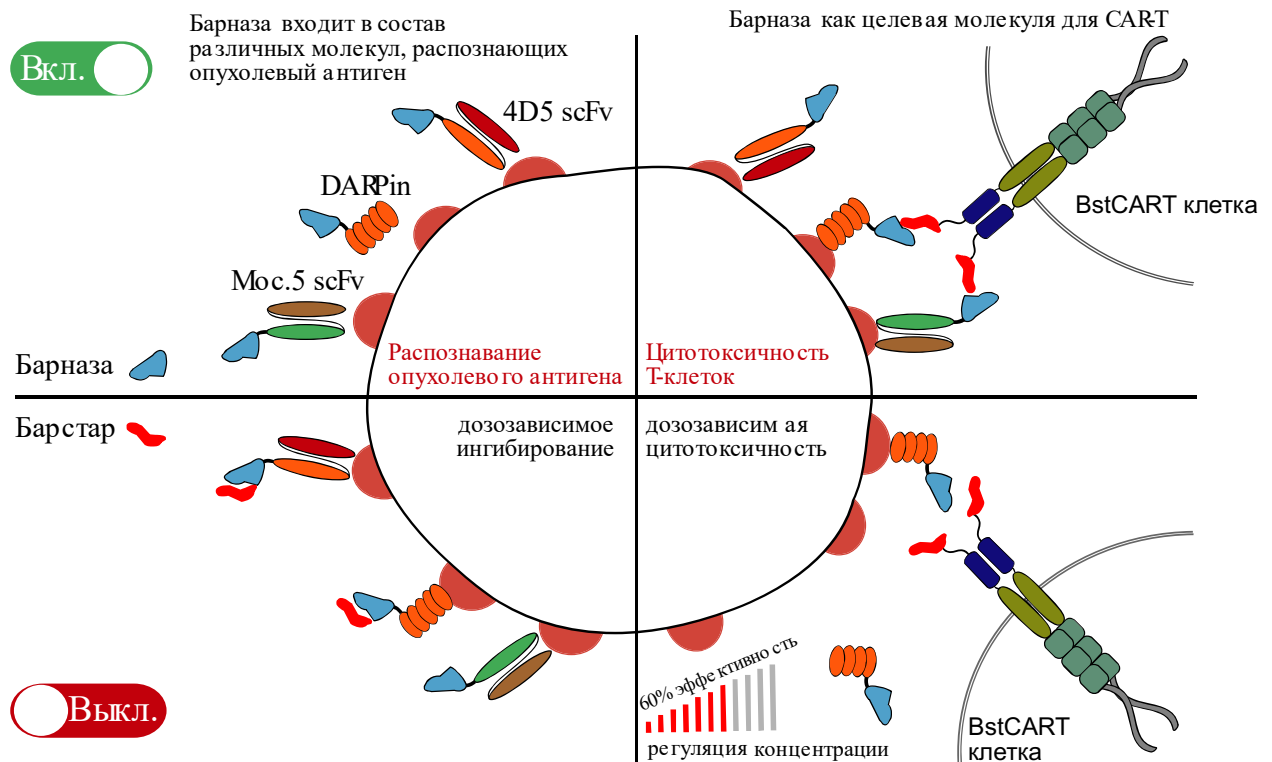


Рисунок 4.25 Возможности модульной системы CAR на основе взаимодействия барназы с барстаром. Барстар в составе CAR позволяет активировать модифицированные Т клетки в присутствии молекул-посредников, содержащих Барназу, слитую с направляющей молекулой (ScFv, наноантитело, дарпин, распознающие TAA).

Одним из наиболее привлекательных опухолевых антигенов как для антител, так и для CAR Т клеток является рецептор эпидермального фактора роста 2 типа (HER2). Повышенная экспрессия гена HER2 характерна для рака пищевода, молочной железы, рака яичника, желудка, толстой кишки, мочевого пузыря, а также рака легких и шейки матки. Для создания адаптерных молекул специфичных к HER2 были использованы дарпин G3 и 9.29, слитые с барназой [342]. Данные дарпины имеют разную аффинность по отношению к рецептору и взаимодействуют с разными участками HER2: G3 с проксимальным доменом IV ($K_D = 0,09$ нМ [343]), а 9.29 с дистальным субдоменом Ic ($K_D = 3,8$ нМ [344]) (Рис. 4.26 А).

Для подтверждения специфического взаимодействия адаптерных молекул с HER2 были получены G3-барназа и 9.29-барназа, конъюгированные с FITC. Методами флуоресцентной микроскопии (Рис. 4.26 Б) и проточной цитофлуориметрии (Рис. 4.26 В) было показано специфическое окрашивание $HER2^+$ клеток ВТ-474. В свою очередь, анализ выживаемости клеток показал специфическую цитотоксичность адаптерных молекул G3-барназа и 9.29-барназа в отношении клеток ВТ-474, где $IC_{50} = 9,4 \pm 1,2$ нМ и $4,2 \pm 0,5$ нМ соответственно (Рис. 4.26 Г).

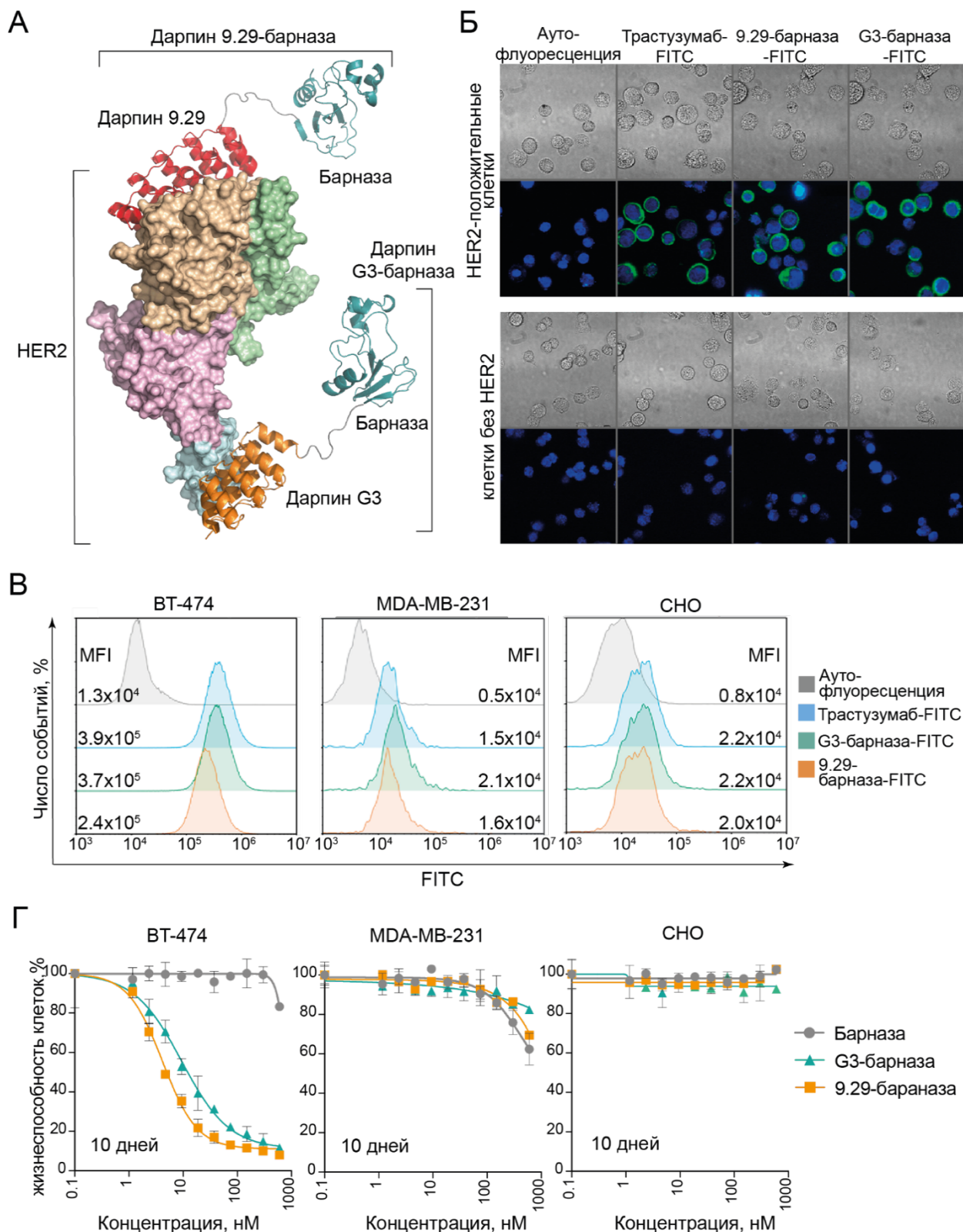


Рисунок 4.26 Анализ специфичности и цитотоксичности молекул-посредников на основе конъюгатов дарпин-барназа. А) Схематическое изображение взаимодействия адаптерных молекул G3-барназа и 9.29-барназа с внеклеточной частью HER2. PDB идентификаторы: HER2 – 1N8Z, G3 – 4HRN, 9.29 – 4HRL, барназа – 1BRS. Б) Конфокальная сканирующая микроскопия HER2⁺ клеток BT-474, окрашенных адаптерными молекулами, конъюгированными с FITC или Трастузумаб-FITC. В) Проточная цитофлуориметрия клеток BT-474, MDA-MB-231 с низким уровнем экспрессии HER2 и контрольных клеток CHO, окрашенных адаптерными молекулами, конъюгированными с FITC или Трастузумаб-FITC. Г) Анализ выживаемости клеток BT-474,

MDA-MB-231 и CHO после инкубации с 9.29-барназой, G3-барназой или свободной барназой с помощью резазурина. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

При создании новых химерных рецепторов важно учитывать особенности взаимодействия антитела с опухолевым антигеном или белком-партнером, в случае регулируемых CAR. В нативных условиях взаимодействие барназы в барстаром происходит в растворе и не ограничено стерически. В свою очередь, включение барстара в состав CAR может повлиять на взаимодействие с барназой или приводить к димеризации рецептора и тонической активации CAR, так как барстар содержит неспаренные цистеины (C40 и C82) [328] (**Рис. 4.27 А**). Также было показано, что изолейцин 87 участвует в гомодимеризации барстара [345]. 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. 4.27 Б**). В состав CAR также входили внеклеточная часть, включающая Fc домен IgG4 с двумя точечными мутациями (L235E; N297Q) для подавления взаимодействия с Fc-рецепторами, трансмембранный и внутриклеточный домен CD28, цитоплазматические домены активации 4-1BB и CD3 ζ (**Рис. 4.27 Б**). Все шесть вариантов BsCAR v1-v6 были наработаны в формате лентивирусных частиц и использованы для трансдукции Т клеток.

Чтобы оценить влияние дизайна химерного рецептора на уровень экспрессии вариантов BsCAR, модифицированные Т клетки были окрашены флуоресцентными антителами, специфичными к Fc домену IgG4. Как видно из данных проточной цитофлуориметрии (**Рис. 4.27 В**), все варианты BsCAR экспрессируются одинаково эффективно, за исключением BsCARv5 (мутация I87E). С другой стороны, Т клетки, экспрессирующие BsCARv4 показали наиболее выраженное окрашивание рекомбинантной барназой, конъюгированной с FITC (**Рис. 4.27 В, правая часть**). Далее был проведен анализ цитотоксичности вариантов BsCAR Т клеток по отношению к клеткам BT-474 в присутствии 9.29-барназы или G3-барназы в концентрации 1 нМ. Полученные данные коррелируют с результатами окрашивания BsCAR Т клеток. При добавлении адаптерных молекул Т клетки, экспрессирующие BsCARv4 (C40A, C82A с длинным линкером), лизировали опухолевые клетки эффективнее остальных вариантов BsCAR (**Рис. 4.27 Г**). Поэтому для дальнейших экспериментов был выбран BsCARv4 (далее по тексту BsCAR).

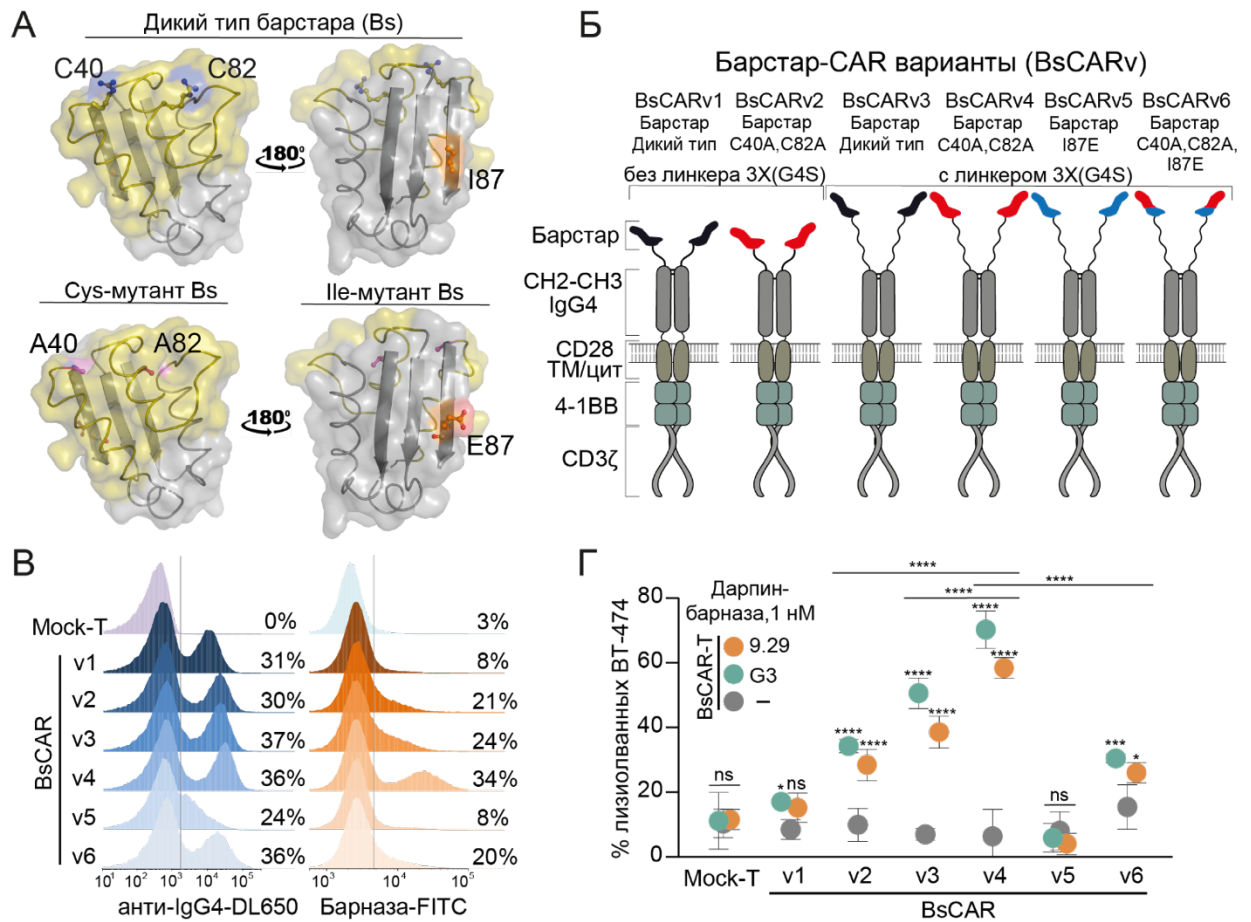


Рисунок 4.27 Создание и сравнение регулируемых BsCAR T клеток на основе взаимодействия барназы с барстаром. А) Структурная модель барстара (PDB: 1BRS), отмечены замененные остатки при создании вариантов BsCAR. Желтым цветом выделена область взаимодействия с барназой. Б) Панель полученных вариантов BsCARv1-v6. BsCAR включали варианты барстара, короткий или длинный линкер, соединенный с CH2-CH3 доменами IgG4, трансмембранный и внутриклеточный домен CD28, цитоплазматические домены активации 4-1BB и CD3ζ. 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. Соотношение BsCAR T-клеток к клеткам BT-474 составляло 10:1 (n=4). Данные были проанализированы с помощью двухстороннего дисперсионного анализа с поправкой Даннета для множественных сравнений и представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Значения p между вариантами BsCAR определяли с помощью непарного t-критерия. Статистическая значимость: *p < 0,05, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

Концепция модульных CAR позволяет не только контролировать активность модифицированных T клеток, но и задавать их специфичность используя разные адаптерные молекулы (Рис. 4.28 А). Для подтверждения возможности регуляции CAR T клеток на основе взаимодействия барназа-барстар был проведен анализ активации и выброса провоспалительных цитокинов ИЛ-2 и ФНО BsCAR T клетками в зависимости от концентрации G3-барназа и 9.29-барназа. В экспериментах *in vitro* было показано, что BsCAR T клетки специфически и дозозависимо от концентрации адаптеров G3-барназа и 9.29-барназа лизируют клетки BT-474 (Рис. 4.28 Б, В). Иммуноферментный анализ

клеточного супернатанта через 24 часа ко-инкубации показал, что BsCAR T клетки секретируют провоспалительные цитокины ИЛ-2 и ИНФ гамма только в присутствии адаптерных молекул и коррелирует с концентрацией G3-барназа или 9.29-барназа (Рис. 4.28 Г, Д).

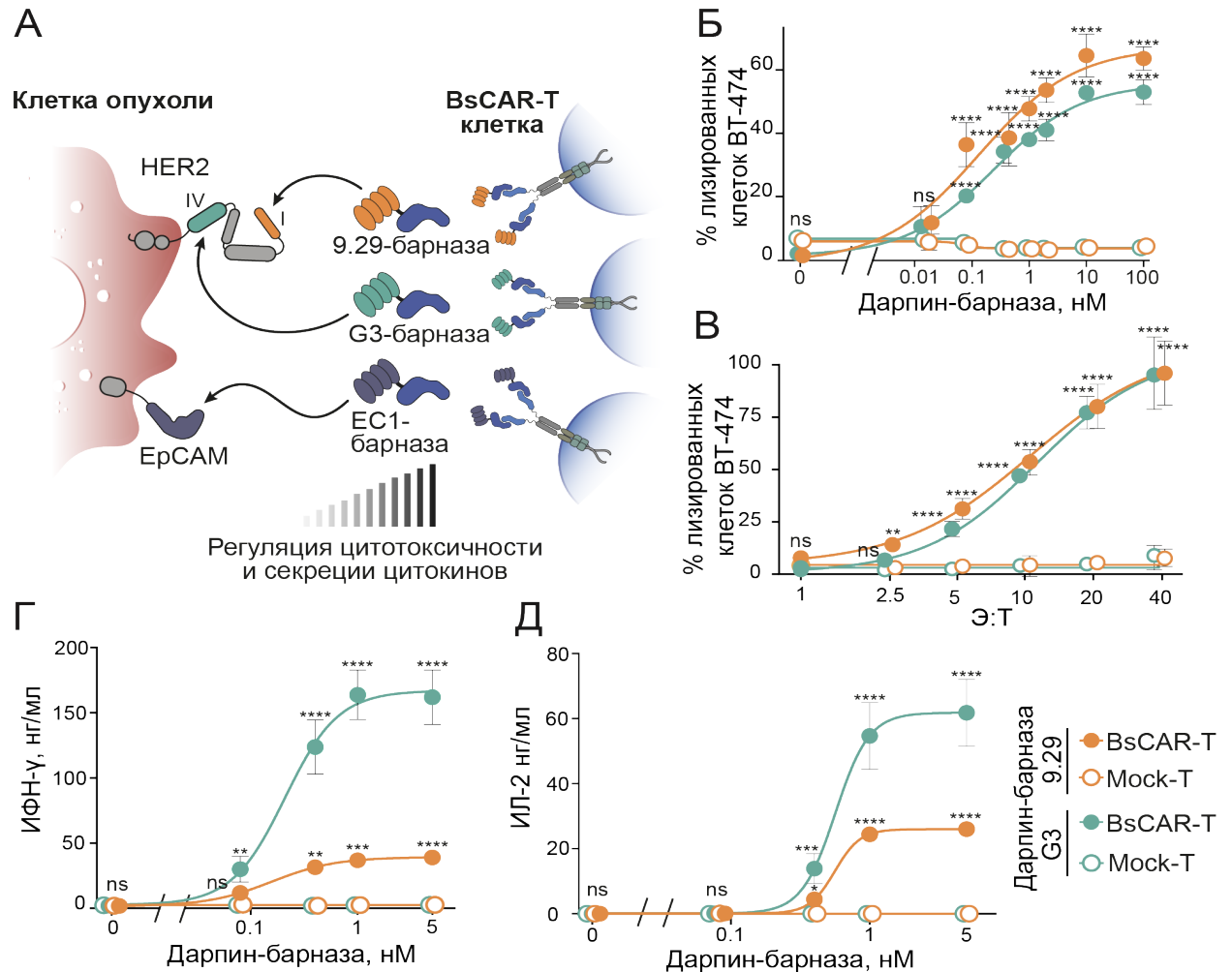


Рисунок 4.28 BsCAR T клетки секретируют провоспалительные цитокины и элиминируют опухолевые клетки BT-474 в присутствии адаптерных молекул 9.29-барназа и G3-барназа *in vitro*. А) Возможности контроля активности и специфичности BsCAR T клеток. Б) Влияние концентраций 9.29-барназы или G3-барназы на цитотоксическую активность BsCAR T клеток в отношении HER2-положительной линии BT-474. Клетки BT-474 инкубировали с BsCAR T при различных концентрациях 9.29-барназы или G3-барназы (соотношение эффекторные:опухолевые 10:1, n=4). В) Лизис клеток BT-474 при различных соотношениях эффекторных и опухолевых клеток в присутствии 1 нМ 9.29-барназы или G3-барназы. Г и Д) Зависимость секреции провоспалительных цитокинов BsCAR T клетками от концентраций 9.29-барназы или G3-барназы (n = 4). Данные были проанализированы с помощью двустороннего дисперсионного анализа с поправкой Даннета для множественных сравнений и представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Статистическая значимость: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001

Далее, с целью определения терапевтического потенциала регулируемых BsCAR T клеток, мышам линии NCG (NOD.CBA-Rag1<null>/Nju) подкожно вводили 2 миллиона клеток BT-474, экспрессирующих люциферазу светлячка (BT-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. 4.29 А**). 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 биолюминесценции (IVIS) и измерение объема опухоли животных из всех экспериментальных групп (**Рис. 4.29 Б, 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. 4.29 Д**).

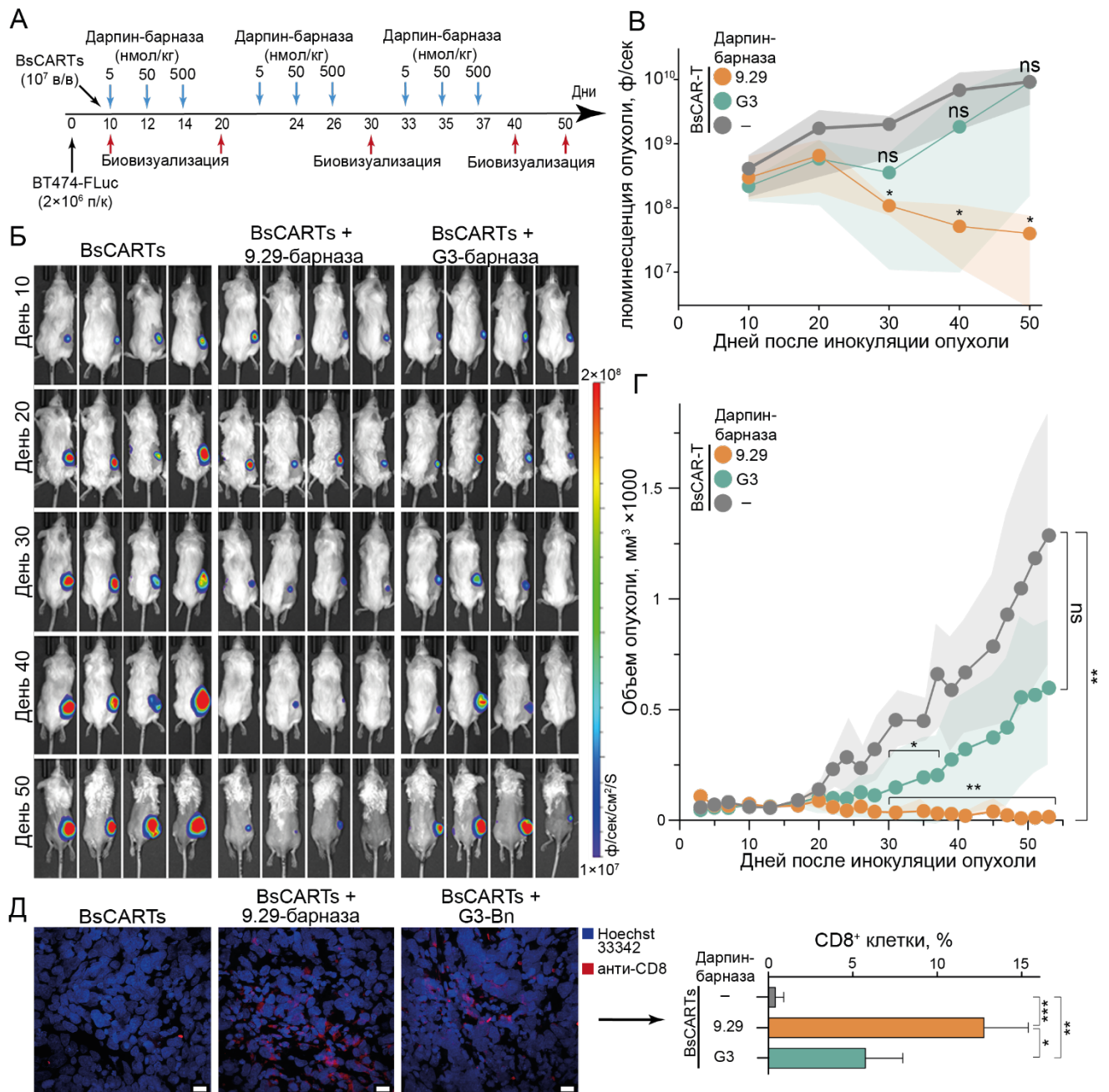


Рисунок 4.29 Анализ противоопухолевой активности BsCAR T клеток и адаптерных молекул 9.29-барназа и G3-барназа в ксенотрансплантатной модели рака молочной железы. А) Схема проведения эксперимента. Мышам линии NCG подкожно имплантировали 2×10^6 клеток BT-474-Luc. Через 10 дней животным внутривенно вводили 10×10^6 BsCAR T клеток. Через два часа животным внутривенно вводили PBS, либо возрастающие дозы 9.29-барназа и G3-барназа (5, 50 и 500 нмоль/кг на 10, 12 и 14 день соответственно) ($n=6$ в каждой группе). Курс инъекций дарпин-барназа повторяли 3 раза с перерывом 9-12 дней. 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 мышь) за период с 10 по 50 день (среднее \pm стандартное отклонение). Для статистического анализа использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA); поправки на множественные сравнения рассчитаны по методу Тьюки. Г) Динамика роста опухоли у мышей контрольной и экспериментальных групп. Данные были проанализированы с помощью критерия Манна-Уитни и представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Статистическая значимость: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Д) Репрезентативные иммуногистохимические изображения срезов опухоли, окрашенных антителами к человеческому CD8 (красный) и Hoechst 33342 (синий). Процент CD8-позитивных клеток определяли в 5 окрашенных срезах трех биологических повторов в каждой группе и анализировали с помощью одностороннего ANOVA с t-критерием множественного

сравнения Тьюки ($n = 3$). Статистическая значимость: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение

Важно отметить возможные ограничения использования экзогенных белков в данных системах. Барназа и барстар потенциально иммуногенны в силу своего бактериального происхождения. Некоторые бактериальные РНКазы (биназы, РНКазы Sa) обладают, тем не менее, низкой иммуногенностью [346-348]. Существуют данные, подтверждающие, что применение барназы и барстара не несет серьезных рисков, связанных со специфическим В-клеточным иммунным ответом [349]. Тем не менее, при дальнейшем развитии модульной системы на основе дарпин-барназы и BsCAR Т клеток, необходимо проведение дополнительных исследований фармакокинетики и иммуногенности молекул-посредников и BsCAR.

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. По результатам выполненной работы были опубликованы статьи в журналах *PNAS* [350] и *Acta Naturae* [351], а также успешно защищена кандидатская диссертация Калинина Романа Сергеевича, в которой автор диссертации выступал в качестве научного руководителя [335].

4.3 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 [352]. Традиционные методы лечения, такие как химиотерапия, инфузия донорских лимфоцитов и повторная трансплантация при рецидиве после алло-ТГСК недостаточно эффективны [353]. К сожалению, эти методы провоцируют острые повреждения других органов и систем органов (например, кишечника) и связаны с отложенными рисками, такими как пожизненный риск вторичного опухолеобразования вследствие мутагенного повреждения ДНК. Важно отметить, что для ряда пациентов невозможно применять предтрансплантационную химио- или радиотерапию в силу наследственных заболеваний, связанных с нарушениями механизмов репарации геномной ДНК (анемия Фанкони, синдром Ниймеген и др.) [354, 355]. Эти нарушения вызывают гиперчувствительность к повреждению ДНК, что является причиной плохого прогноза для таких пациентов при использовании стандартных доз генотоксических препаратов [356]. 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% [65, 357, 358]. В доклинических исследованиях уже продемонстрирована эффективная миелоабляция ГСК и клеток предшественников CAR T клетками, специфичными к CD117 [359, 360], CD33 [115] и CD123 [361, 362]. 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 белок CD45 тирозиновая фосфатаза, 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) [363-365]. 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.

4.3.1 Создание CD45⁴ CAR45 Т клеток, устойчивых к фратрициду, для адоптивной иммунотерапии терапии гемопоэтических опухолей

Основным препятствием к созданию CAR Т клеток специфичных к CD45 является кросс-цитотоксичность CAR клеток по отношению к CD45 на поверхности Т клеток (фратрицид от англ. fratricide, братоубийство или “огонь по своим”). Развитие технологий редактирования генома сделало возможным нокаут генов поверхностных рецепторов Т клеток и стало отдельным направлением в иммунотерапии.

Для создания CD45 CAR Т клеток устойчивых к аутоксичности с помощью системы CRISPR/Cas9 был проведен нокаут гена *PTPRC*, кодирующего CD45. С использованием алгоритмов CRISPOR (Tefor Infrastructure, Франция) были подобраны последовательности gRNA, специфичных к гену *PTPRC*: gRNA1 GGATTTGTGGCTTAAACTCT; gRNA2 GGGTTTAAGCCACAAATACA; gRNA3 GGCACACTTATACTCATGTT. Выбранные gRNA были синтезированы и, в комплексе с Cas9, использованы для электропорации Т клеток. Цитофлуориметрический анализ эффективности нокаута гена *PTPRC* показал, что gRNA2 к экзону 1 оказалась наиболее эффективна (Рис. 4.30).

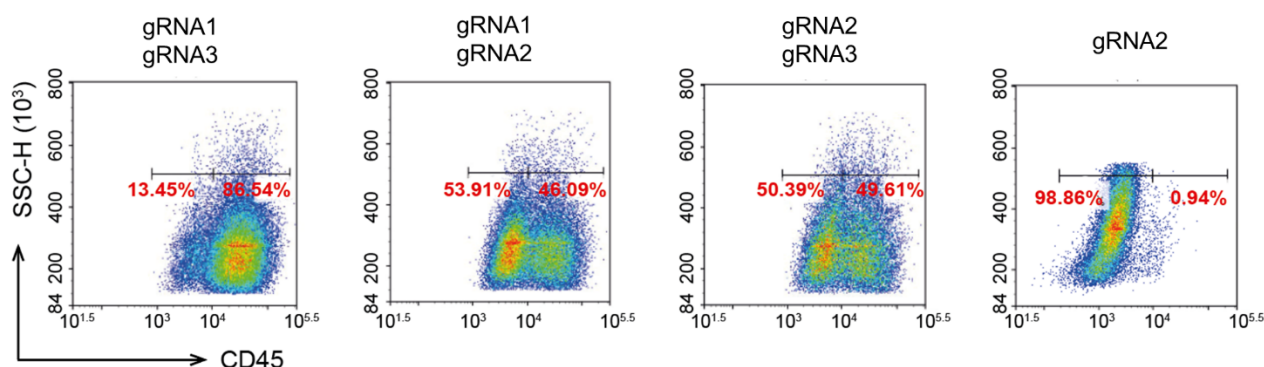


Рисунок 4.30 Сравнительный анализ эффективности нокаута гена *PTPRC* в Т клетках. Цитофлуориметрический анализ экспрессии CD45 в Т клетках через четыре дня после электропорации гидовыми РНК и Cas9.

Эффективность нокаута гена *PTPRC* была дополнительно подтверждена с помощью конфокальной микроскопии (Рис. 4.31 А) и вестерн-блоттинга лизата Т клеток (Рис. 4.31 Б). Секвенирование участка гена *PTPRC*, узнаваемого gRNA2, подтвердило наличие двуцепочечного разрыва в таргетируемой области (Рис. 4.31В).

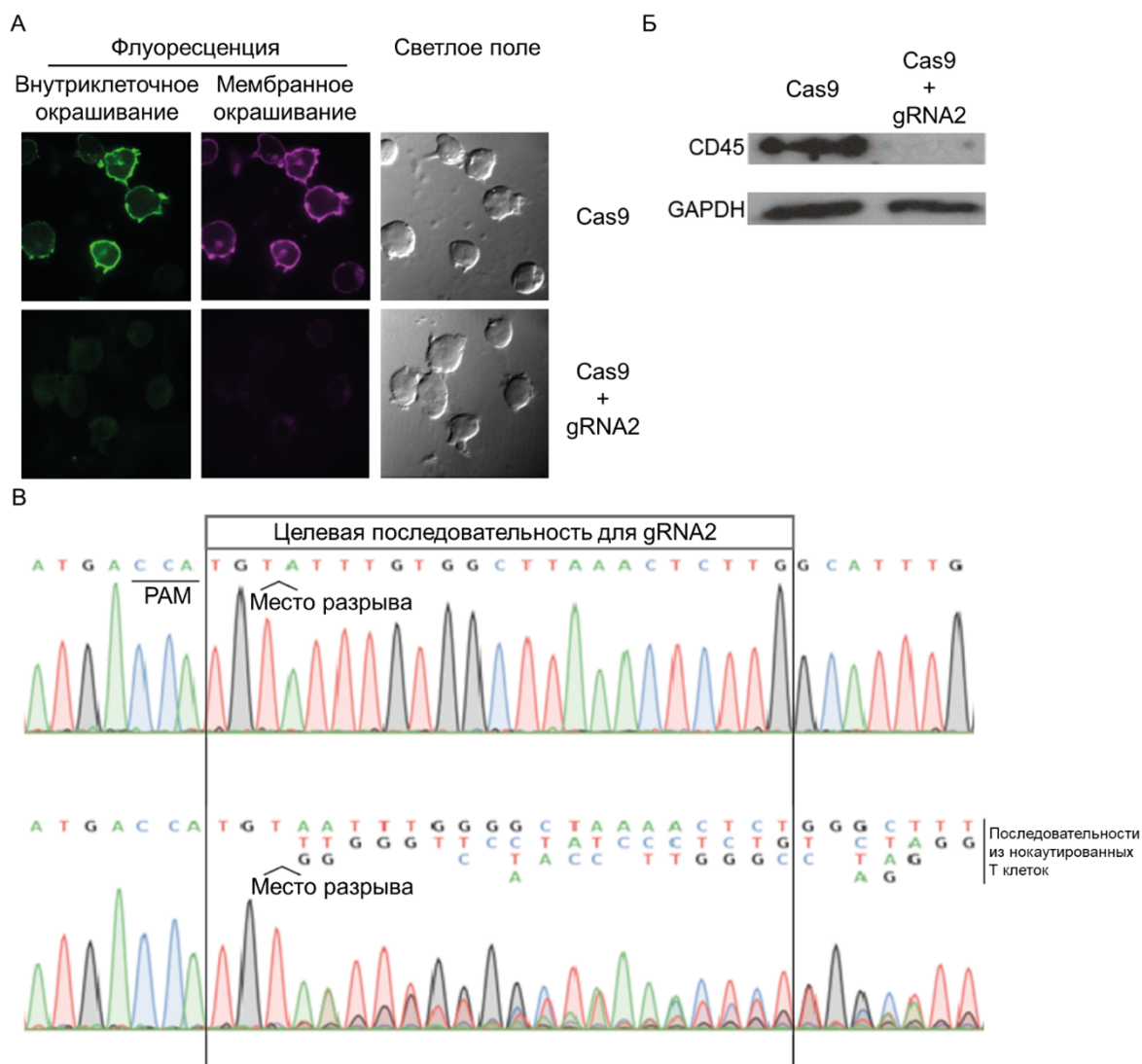


Рисунок 4.31 Анализ эффективности нокаута гена *PTPRC* в Т клетках. А) Конфокальная микроскопия Т клеток после геномного редактирования гена *PTPRC*, окрашенных флуоресцентно мечеными анти-CD45 антителами. Б) Вестерн-блот анализ экспрессии CD45 в Т клетках из А). В) Секвенирование продукта ПЦР, содержащего 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. Процесс получения CD45^Δ CAR19 Т клеток представлен на **рисунке 4.32**.

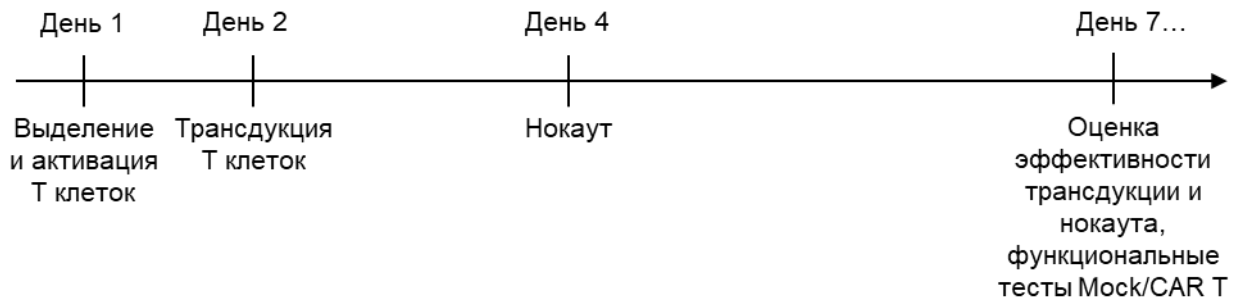


Рисунок 4.32 Схема получения CD45 Δ CAR19 Т клеток.

Цитофлуориметрический анализ показал, что на 7 день с момента выделения Т клеток, в культуре находится популяция CAR19 Т клеток, нокаутных по CD45 (CD45 Δ CAR19 Т клетки) (Рис. 4.33). Эффективность нокаута гена *PTPRC* составила 90,7%, а процент трансдукции составил 76,8% CD45 Δ CAR19 Т клеток и 93,48% для CAR19 Т клеток. Результаты окрашивания подтвердили эффективность разработанного протокола получения CD45 Δ CAR19 Т клеток с высоким процентом нокаута и трансдукции.

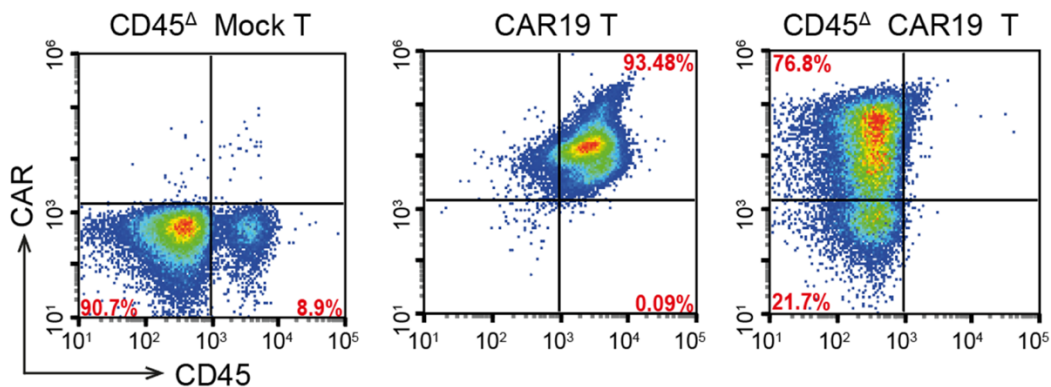


Рисунок 4.33 Анализ эффективности трансдукции CAR19 и нокаута гена *PTPRC* в Т лимфоцитах на 7 день с момента выделения.

Популяция CD45 Δ CAR19 Т клеток оказалась стабильной в течение 2-3 недель. 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. 4.34 А). 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. 4.34 Б, В). Таким образом, можно сделать вывод, что CAR Т клетки, в значительной степени, сохраняют функциональную активность в отсутствии CD45.

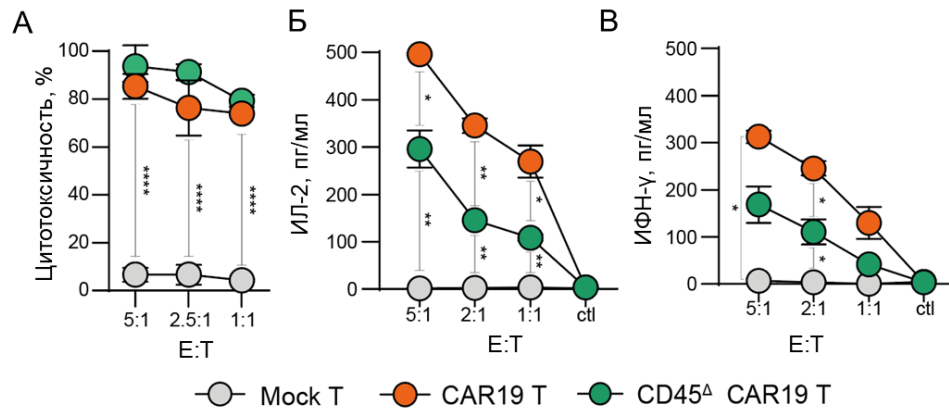


Рисунок 4.34 Сравнительный анализ активности CD45 Δ CAR19 Т клеток и CAR19 Т клеток. А) Цитотоксичность CD45 Δ CAR19 Т клеток и CAR19 Т клеток в отношении клеток линии Jeko-1 при различных соотношениях Е:Т. Б и В) Анализ продукции провоспалительных цитокинов ИЛ-2 и ИФН- γ Mock и CAR Т клетками.

Для подтверждения эффективности CD45 Δ CAR19 Т клеток на уровне организма были проведены эксперименты *in vivo*. Мышам линии NCG (NOD.CBA-Rag1^{null}/Nju) внутривенно вводили 1 миллион клеток Nalm-6 ffLuc/GFP, экспрессирующих люциферазу светлячка. Данная ксеногенная модель является основной в области исследования активности CAR Т клеток специфичных к CD19 для терапии лейкозов и лимфом. Через 7 дней животным во всех группах внутривенно вводили Mock, CAR19 или CD45 Δ CAR19 Т клетки (n=6). Для наблюдения за динамикой роста опухоли был проведен анализ прижизненной визуализации биoluminesценции (IVIS) животных из всех экспериментальных группах (**Рис. 4.35 А**). CD45 Δ CAR19 Т клетки эффективно элиминировали опухолевые клетки *in vivo* (**Рис. 4.35 Б**), что привело к лучшей выживаемости животных (**Рис. 4.35 В**).

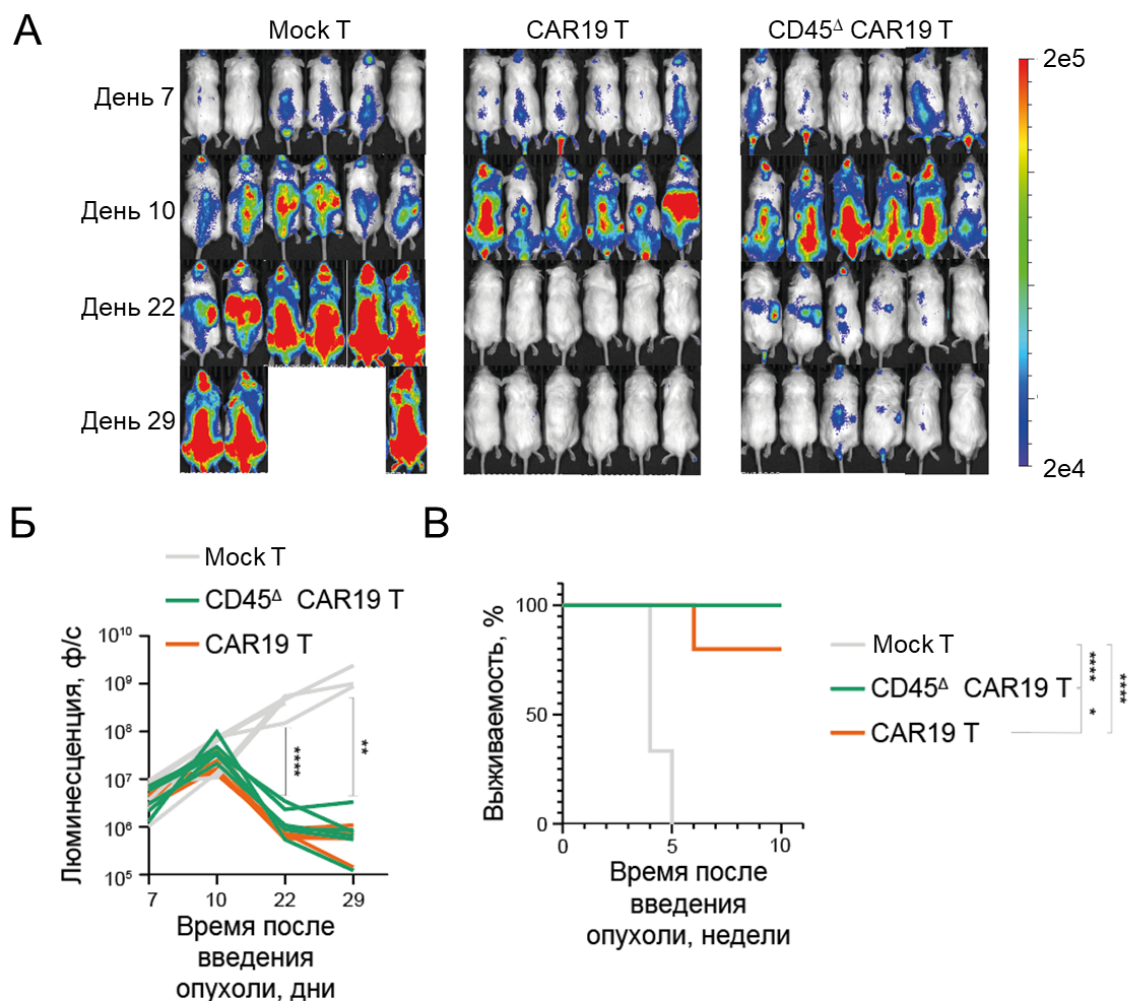


Рисунок 4.35 CD45 Δ CAR19 T клетки эффективно элиминируют опухоль *in vivo*. А) Прижизненная визуализация динамики роста опухоли у мышей из групп, получавших Mock, CAR19 или CD45 Δ CAR19 T клетки (n=6). Б) Количественная оценка роста опухоли (люциферазной активности на мыш) за период с 7 по 29 день (среднее \pm стандартное отклонение). Для статистического анализа использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA); поправки на множественные сравнения рассчитаны по методу Тьюки. В) Кривые выживаемости животных из контрольной и экспериментальных групп, построенные по методу Каплана–Майера. Все данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

На основании полученных данных было решено создать и охарактеризовать CAR T клетки специфичных к CD45 с нокаутом гена *PTPRC* (CD45 Δ CAR45). В качестве распознающего домена CAR45 был выбран scFv клона BC8 анти-CD45 антитела [366] (**Рис. 4.36**). Данное антитело обладает хорошо охарактеризованным профилем безопасности и специфичности, так как было использовано в доклинических [367-370] и клинических исследованиях, как в виде свободного антитела, так и в формате конъюгатов с различными химио- и радиотерапевтическими препаратами (#NCT00002554, #NCT00003868, #NCT00003870, #NCT00005940, #NCT00008177, #NCT00988715, #NCT01300572, #NCT01503242, #NCT01921387 – clinicaltrials.gov).

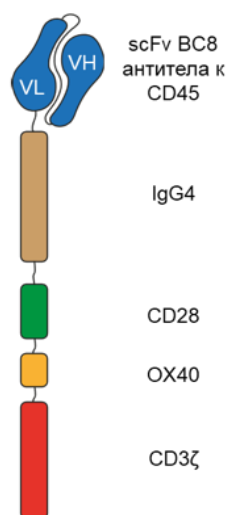


Рисунок 4.36 Схема строения CAR45. scFv (single-chain variable fragment) – одноцепочечный переменный фрагмент антитела BC8; IgG4 шарнирная область CAR, которая содержит CH2-CH3 домены IgG4; CD28 – трансмембранная и внутриклеточная часть CD28; OX40 – внутриклеточная часть человеческого CD134, которая формирует второй ко-стимулирующий домен CAR; CD3 ζ – внутриклеточная часть человеческого CD3 ζ .

Однако, в отличие от CD45 Δ CAR19, CD45 Δ CAR45 Т клетки обладали низкой жизнеспособностью (**Рис. 4.37 А**). Уже через неделю после трансдукции CAR45, Т клетки, независимо от нокаута *PTPRC*, погибали. Так как на поверхности Т клеток CD45 присутствует в большом количестве, вероятно, после нокаута CD45 рецептор еще долго остается на мембране. Данные количества недостаточны для выраженного окрашивания клеток и детекции методом проточной цитофлуориметрии, но могут быть распознаны CAR на Т клетках. В исследовании, посвященном созданию CD7 CAR Т клеток для предотвращения фратрицида в процессе *ex vivo* экспансии, был использован обратимый ингибитор тирозиновых киназ широкого спектра действия дазатиниб [371]. CD45 Δ CAR45 Т клеток были получены снова, но после трансдукции к клеткам были добавлены разные концентрации дазатиниба (25, 50, 100 нМ). Как видно из данных, представленных на **рисунке 4.37 Б** дазатиниб в концентрации 50 нМ поддерживает жизнеспособность CD45 Δ CAR45 Т клеток на высоком уровне. Важно отметить, что добавление дазатиниба не оказывает негативного влияния на экспансию CD45 Δ CAR45 Т клеток (**Рис. 4.37 В, Г**), и со временем в культуре возрастает процент CAR-позитивных, CD45-негативных Т лимфоцитов (**Рис. 4.37 Д**).

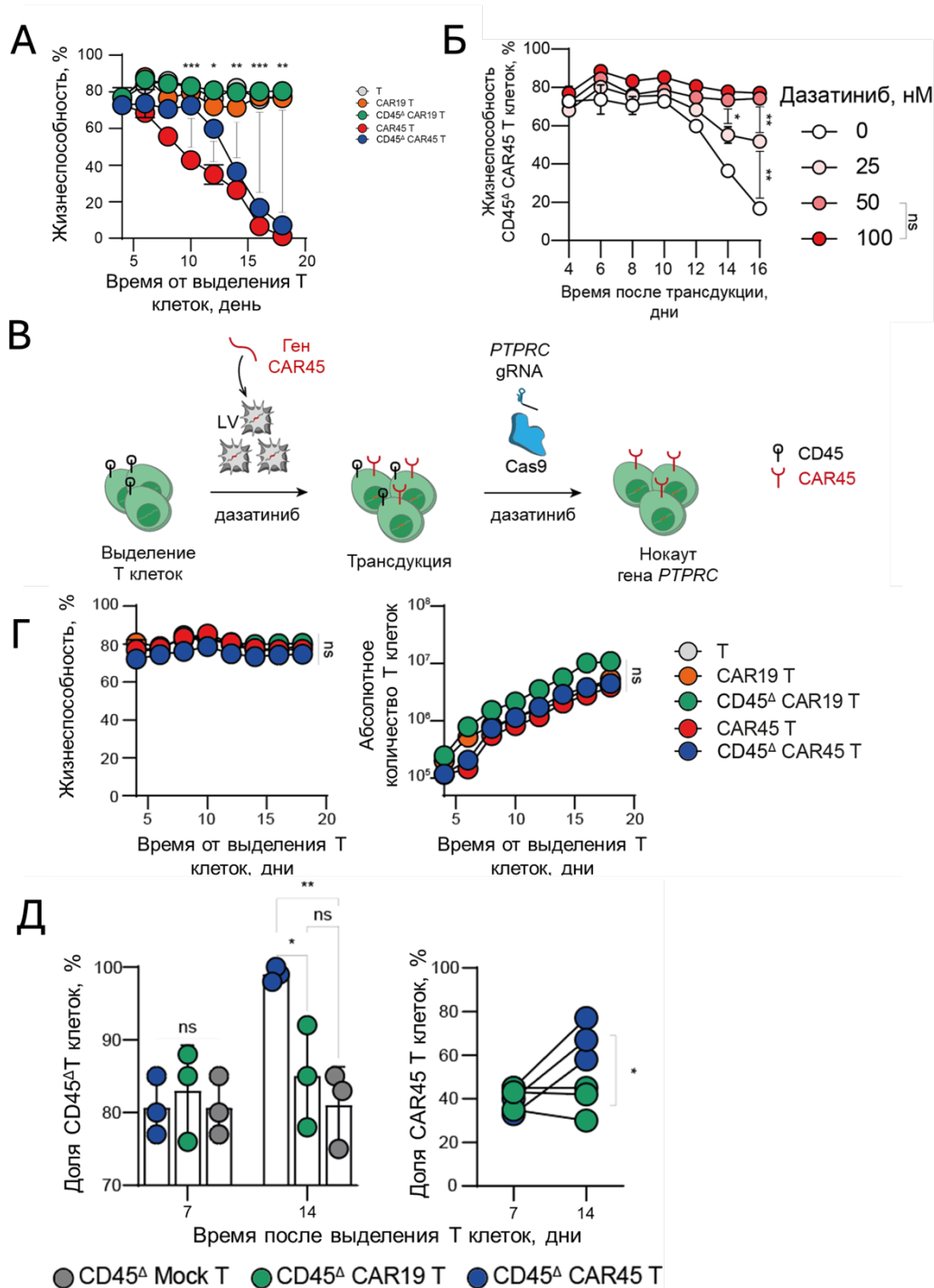


Рисунок 4.37 Оптимизация протокола получения CD45^Δ CAR45 Т клеток. А) Анализ жизнеспособности контрольных, CAR19, CD45^Δ CAR19, CAR45 и CD45^Δ CAR45 Т клеток. Б) Анализ жизнеспособности CD45^Δ CAR45 Т клеток в присутствии дазатиниба в концентрации 25, 50 и 100 нМ. В) Схема оптимизированного протокола получения CD45^Δ CAR45 Т клеток. Г) Анализ влияния 50 нМ дазатиниба на выживаемость и экспансию CAR19, CD45^Δ CAR19, CAR45 и CD45^Δ CAR45 Т клеток. Д) Изменение доли CAR-позитивной и CD45-негативной Т клеточных популяций в процессе экспансии клеток.

Популяционный состав CAR Т клеточного продукта во многом определяет эффективность адоптивной иммунотерапии. Из-за нокаута гена *PTPRC* иммунофенотипирование CD45^Δ Т лимфоцитов возможно по другим характерным маркерам: CD62L, CD27 и CD95. Анализ фенотипа CD45^Δ CAR45 Т клеток показал, что они

в основном представлены T_{CM} и T_{EM} лимфоцитами (**Рис. 4.38**). Такое распределение популяции Т клеток является оптимальным при CAR терапии.

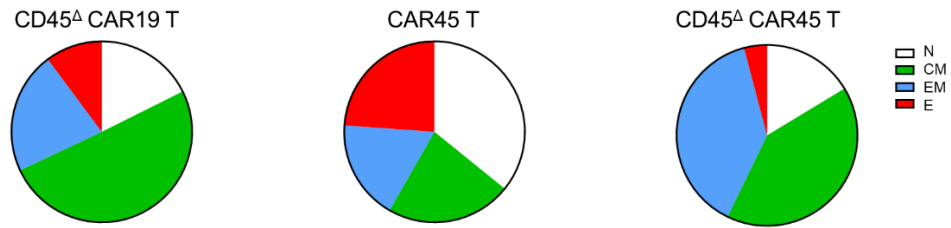


Рисунок 4.38 Фенотипирование $CD45^{\Delta}$ CAR19, CAR45 и $CD45^{\Delta}$ CAR45 Т клеток на 14 день экспансии; N – наивные ($CD62L+CD27^{hi}CD95^{-}$), CM – центральной памяти ($CD62L+CD27^{hi}CD95^{+}$), EM – эффекторной памяти ($CD62L-CD27^{lo}CD95^{+}$), E – эффекторные, или терминально дифференцированные ($CD62L-CD27-CD95^{+}$).

Следующим этапом после оптимизации протокола получения было подтверждение специфичности и эффективности $CD45^{\Delta}$ CAR45 Т клеток в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих CD45. Для этого была выбрана панель стабильных опухолевых линий человека, представляющих различные нозологии: острый Т-клеточный лейкоз, мантийно-клеточная лимфома, острый моноцитарный лейкоз, а также контрольные клетки острого лимфобластного лейкоза без CD45 (**Рис. 4.39 А**). Сравнительный анализ цитотоксической активности показал, что $CD45^{\Delta}$ 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. 4.39 Б**). Интересно, что анализе эффективности лизиса клеток Jeko-1 (которые имеют как CD45, так и CD19) в режиме реального времени $CD45^{\Delta}$ CAR45 Т клетки оказались более эффективными, чем обычные не-нокаутные по CD45 CAR19 Т клетки (**Рис. 4.39 В**). Важно отметить, что CAR45 Т клетки без нокаута CD45 показали низкую цитотоксичность по всем тестам. 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. 4.39 Г**). Полученные данные подтверждают, что $CD45^{\Delta}$ CAR45 Т клетки эффективно лизируют CD45-положительные опухолевые клетки человека *in vitro*.

Чтобы изучить терапевтический потенциал $CD45^{\Delta}$ 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 [372]. Мышам линии NCG внутривенно трансплантировали клетки THP-1 ffLuc/GFP и, после развития опухоли, вводили Mock Т клетки, CAR45 Т клетки или $CD45^{\Delta}$ CAR45 Т клетки (**Рис. 4.39 Д**). Как видно из данных, представленных на **рисунке 4.39 Д и Е** $CD45^{\Delta}$ CAR45 Т клетки, но не CAR45 Т клетки,

эффективно подавляют рост опухолевых клеток и существенно увеличивают выживаемость животных (Рис. 4.39 Ж).

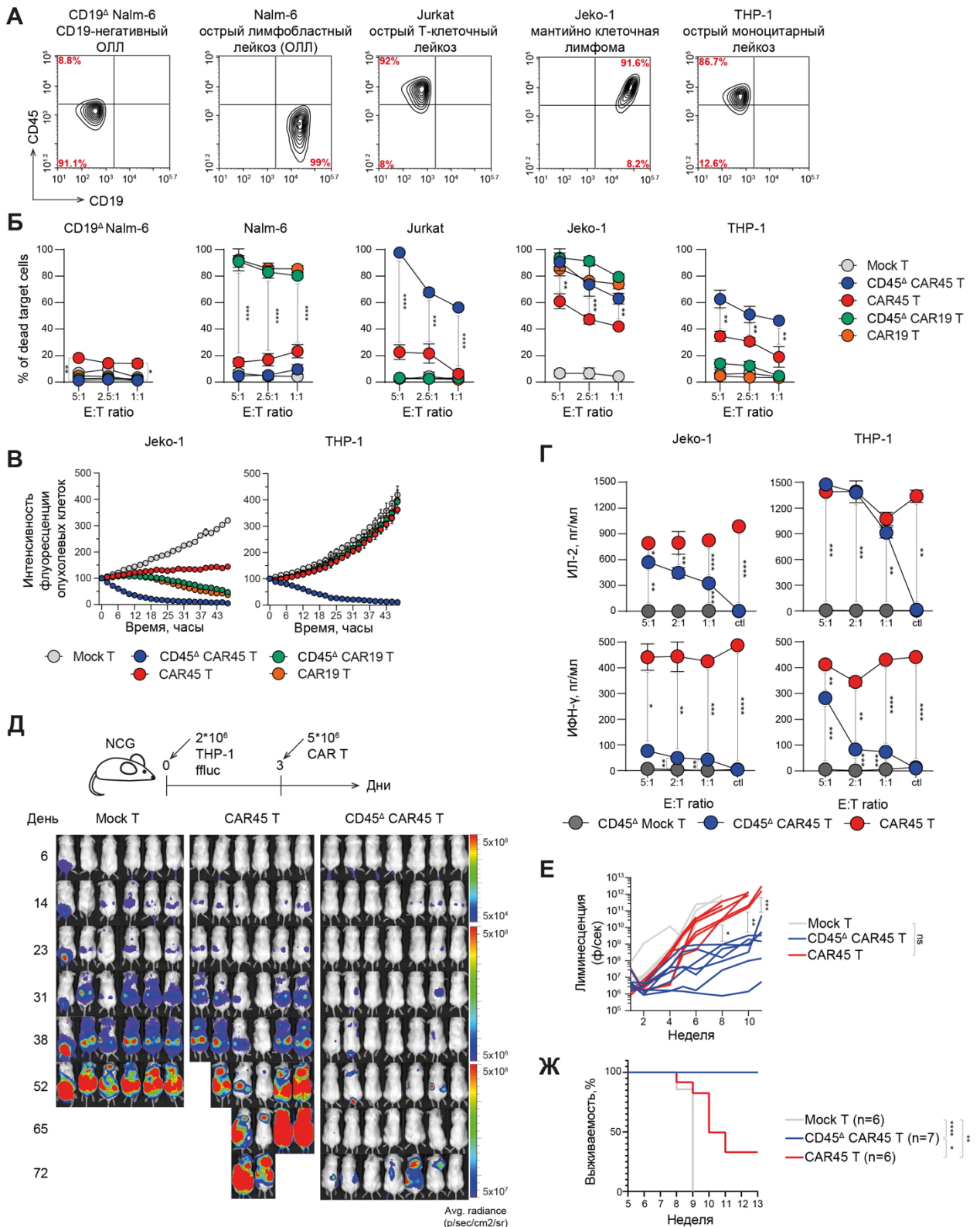


Рисунок 4.39 Противоопухолевая активность CD45^Δ CAR45 T клеток *in vitro* и *in vivo*.

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 Т клеток в ксеногенной модели острого моноцитарного лейкоза. Ж) Кривые выживаемости животных из контрольной и экспериментальных групп, построенные по методу Каплана–Майера.

Для подтверждения возможности применения CD45 Δ CAR45 Т клеток для предтрансплантационной подготовки пациентов перед трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (bridging CAR Т therapy) были получены мыши с подсаженными PBMC пациентов [373]. Иммунодефицитным мышам линии NCG проводили миелоабляцию тресульфаном и, на следующий день, вводили периферические клетки пациентов (аутологичные для CAR Т клеток) (**Рис. 4.40 А**). 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 (n=7) 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. 4.40 Б, В**). Полученные данные подтверждают возможность элиминации CD45-позитивных клеток пациента CD45 Δ CAR45 Т клетками *in vivo*.

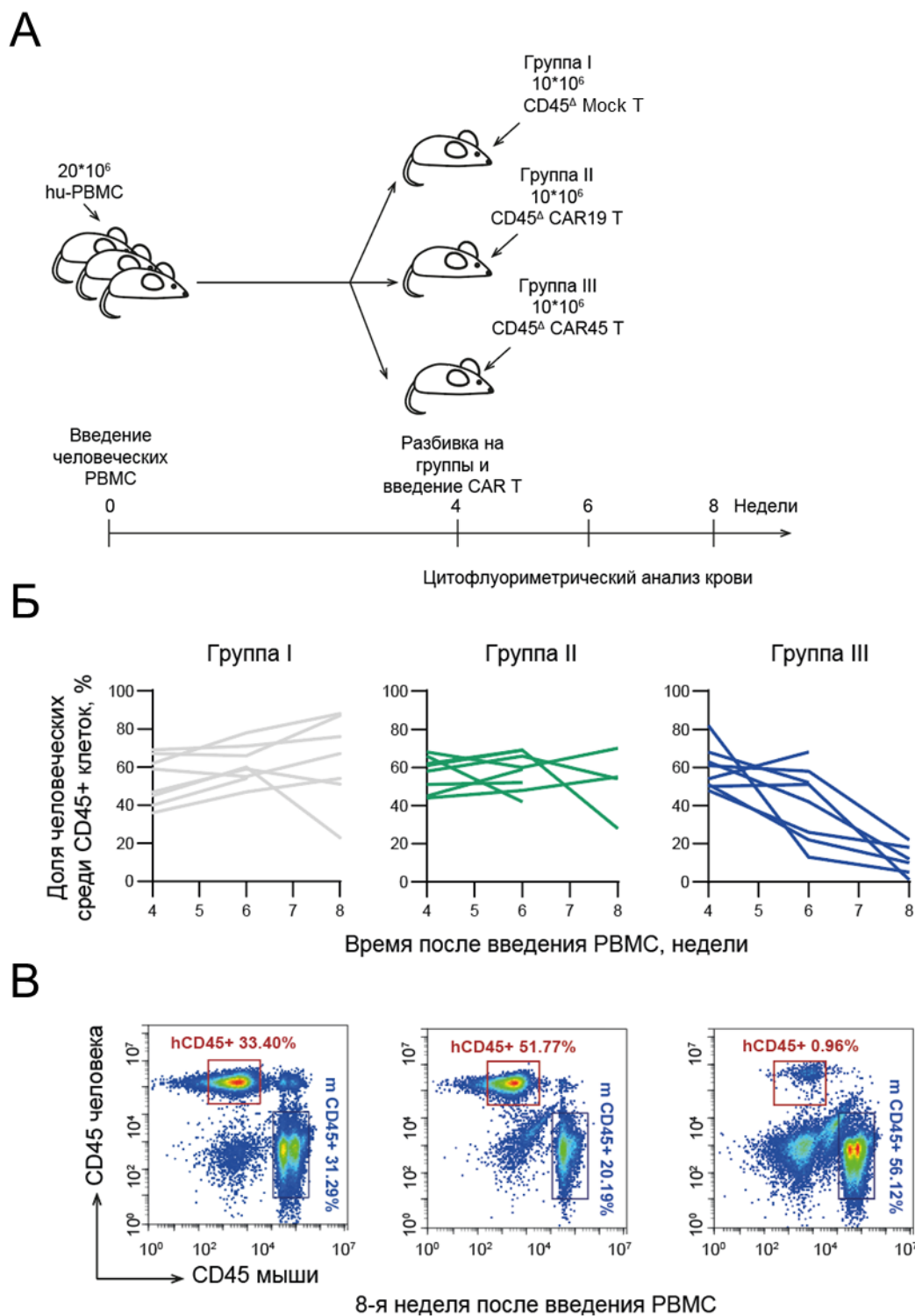


Рисунок 4.40 Анализ элиминации аутологичных PBMC пациентов CD45 $^{\Delta}$ CAR45 T клетками *in vivo*. А) Схема эксперимента. Б) Изменение химеризма животных после введения CD45 $^{\Delta}$ Mock T, CD45 $^{\Delta}$ CAR19 либо CD45 $^{\Delta}$ CAR45 T клеток. В) Анализ химеризма клеток крови мышей на 8 неделю после введения T клеток.

Важно отметить, что для проведения клинических испытаний необходимо учитывать способы защиты пациента от длительной персистенции CD45 $^{\Delta}$ CAR45 T клеток, которые могут осложнить трансплантацию донорских ГСК. Применять защитные меры

можно либо после терапии, либо на этапе получения CD45^A CAR45 Т клеток. Например, можно проводить дополнительное кондиционирование пониженной интенсивности после введения CD45^A CAR45 Т клеток. На этапе производства CAR Т клеток можно модифицировать Т лимфоциты дополнительными маркерами для их индуцируемого лизиса или модифицировать Т лимфоциты с помощью мРНК, кодирующей CAR45, которая обеспечивает временную экспрессию рецептора. Эти и другие методы модификации уже доказали свою эффективность в параллельных исследованиях различных CAR Т клеток [374-378]. В результате нами были получены устойчивые к аутоксичности CD45-специфичные CD45^A CAR45 Т клетки, которые продемонстрировали, что они эффективно элиминируют человеческие CD45-позитивные клетки крови, включая злокачественные, на релевантных животных моделях. По результатам выполненной работы были опубликованы статьи в журналах *Molecular Therapy Oncology* [379] и *Acta Naturae* [104], а также успешно защищена кандидатская диссертация Волкова Дмитрия Васильевича [380], в которой автор диссертации выступал в качестве научного руководителя.

4.3.2 Исследование терапевтического потенциала аллогенных CAR19 Т клеток, произведенных из CD45RA-негативных Т клеток памяти.

Несмотря на высокую эффективность CAR19 Т клеток для терапии В-ОЛЛ, у части пациентов ремиссия может смениться рецидивом, лечение которого часто включает в себя новые курсы химио- или радиотерапии. Пять пациентов Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии и онкологии имени Дмитрия Рогачева, страдающих В-клеточным острым лимфобластным лейкозом, прошли курс как традиционных, так и иммунотерапевтических методов лечения, среди которых были терапия аутологичными CAR19 Т клетками, блинатумомабом и ТГСК. Несмотря на это, у пациентов наблюдались повторные рецидивы. Альтернативным вариантом лечения этих пациентов является использование аллогенных CAR Т клеток из лимфоцитов, обладающих более высокой функциональной активностью по сравнению с Т лимфоцитами пациента. Однако, алло-CAR Т терапия сопряжена с высоким риском развития реакции трансплантата против хозяина (РТПХ). Предыдущие наблюдения за пациентами, прошедшими ТГСК, показали, что для противостояния вирусным инфекциям после трансплантации можно применять инфузию Т клеток памяти от гаплоидентичных доноров, что снижает риск осложнений от реактивации вирусных инфекций при отсутствии тяжелых случаев РТПХ [381]. Доклинические исследования продемонстрировали, что CAR Т клетки, полученные из Т клеток памяти, обладают такой же эффективностью в элиминации опухолей, как и традиционные CAR Т клетки, при этом при аллогенном трансплантации не вызывают

тяжелых реакций трансплантата против хозяина у животных [382]. На основании полученных данных сотрудниками НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева было принято решение о проведении первого в мире клинического испытания CAR19 Tm клеток для этих пяти пациентов.

Для производства CAR19 Tm клеток была использована система CliniMACS (Miltenyi Biotec, Германия), которая обеспечивает закрытый цикл производства CAR T клеток из CD45RA-отрицательных Т-лимфоцитов. Цитофлуориметрический анализ показал, что в клеточном продукте большую часть CAR19 Tm клеток составляют CD4+ Т лимфоциты (что иногда встречается в обычной практике применения CAR19 Т клеток) (**Рис. 4.41 А**). Разница в эффективности трансдукции (**Рис. 4.41 Б**), вероятно, была обусловлена разными донорами. Фенотипически большая часть CAR19 Tm клеток – это T_{ЕМ} лимфоциты, что означает более дифференцированную популяцию с меньшей склонностью к пролиферации по сравнению со стандартными CAR19 Т клетками, большая часть из которых – это T_{СМ} лимфоциты (**Рис. 4.41 В**). Также, CAR19 Tm клетки имели повышенный уровень экспрессии маркеров истощения LAG3 и TIGIT по сравнению с CAR19 Т клетками, полученными ранее (**Рис. 4.41 Г**).

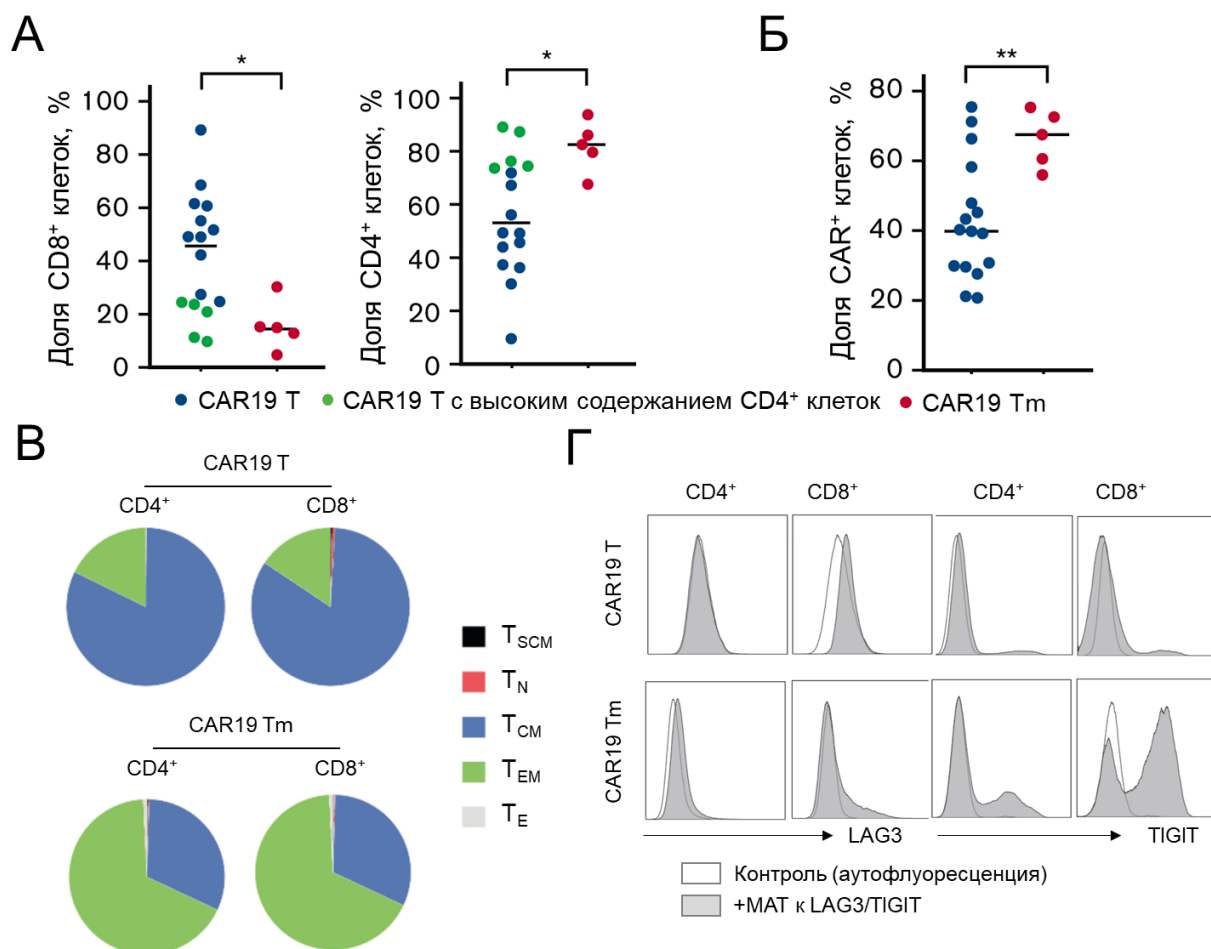


Рисунок 4.41 Анализ состава клеточного продукта CAR19 Tm клеток. А) Соотношение CD8⁺ и CD4⁺ Т лимфоцитов. Б) Процент трансдукции Т клеток CAR19. В) Фенотип CD8⁺ и CD4⁺ популяций CAR Т клеток. Г) Анализ экспрессии маркеров истощения LAG3 и TIGIT.

Однако, несмотря на то что фенотипически CAR19 Tm клетки отличались от CAR19 Т клеток, введение CAR19 Tm клеток оказалось эффективным для четырех из пяти пациентов (Таблица 4.1). Дизайн терапевтического протокола и клинические испытания проводились на базе НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Эффективность терапии оценивали по уровню минимального остаточного заболевания (MRD).

Таблица 4.1 Эффективность терапии пациентов с рецидивом ОЛЛ CAR19 Tm клетками

Пациент	Донор	Ремиссия на 30 день	РТПХ, степень	Выживаемость пациентов, дни
#1	Гаплоидентичный	MRD-	0	559+
#2	Гаплоидентичный	MRD-	0	460+
#3	Гаплоидентичный	детекция MRD+	1	685+
#4	Гаплоидентичный	MRD-	0	604+
#5	Гаплоидентичный	прогрессирование заболевания	0	40
MRD – минимальное остаточное заболевание				

Важно отметить, что в ходе наблюдения за пациентами не было выявлено случаев тяжелых (3 и 4 степени) реакций токсичности препарата (1 пациент с 1 степенью РТПХ), синдрома кортикальной реакции (2 пациента с 1 и 2 степенью CRS) и нейротоксичности (у тех же 2 пациентов с CRS, но оба имели 1 степень нейротоксичности). Анализ персистенции клеток показал, что только у одного из пациентов CAR19 Tm клетки детектируются в крови цитометрически. Это контрастирует с характерной картиной применения обычных CAR19 T клеток (**Рис. 4.42**). Такие различия, предположительно, обусловлены разницей в популяционном составе, который сильно влияет на состояние Т-лимфоцитов *in vivo*. Для изучения природы отличия в функциональной активности CAR19 Tm и CAR19 T был проведен ряд экспериментов *in vitro* и *ex vivo*.

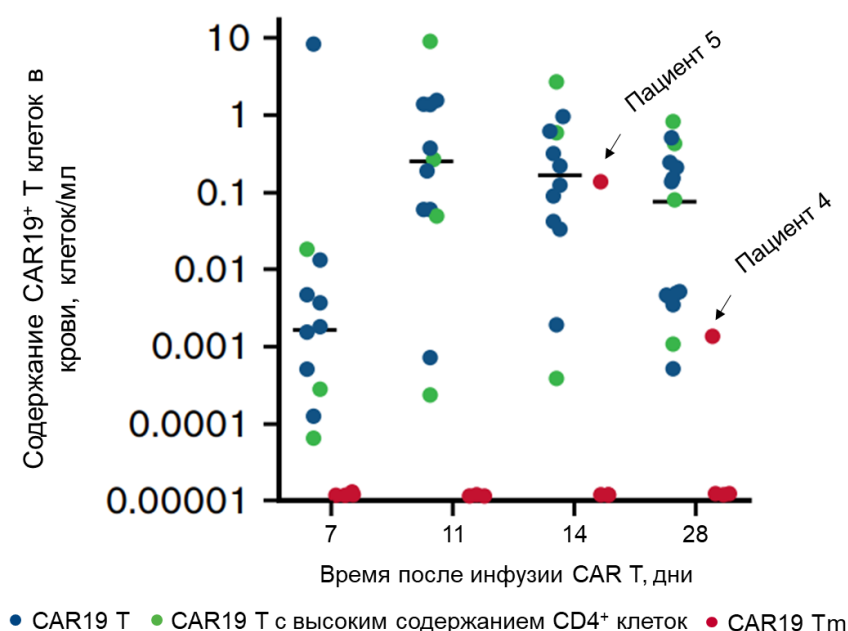


Рисунок 4.42 Анализ и сравнение персистенции CAR19 Tm клеток. На график добавлены ретроспективные данные, полученные при терапии пациентов CAR19 T клетками (синий) и CAR19 T клетками с высоким содержанием CD4 T клеток (зеленый). Каждый пациент представлен отдельной точкой, для некоторых пациентов (#1-#4) показаны результаты как после терапии CAR19 T клетками, так и CAR19 Tm клетками. Стрелки указывают на пациентов, у которых в крови в определенный момент после терапии были обнаружены CAR19 Tm клетки.

Анализ цитотоксичности CAR T клеток показал, что CAR19 Tm и CAR19 T клетки с одинаковой эффективностью лизируют клетки линии Jeko-1 (**Рис. 4.43**).

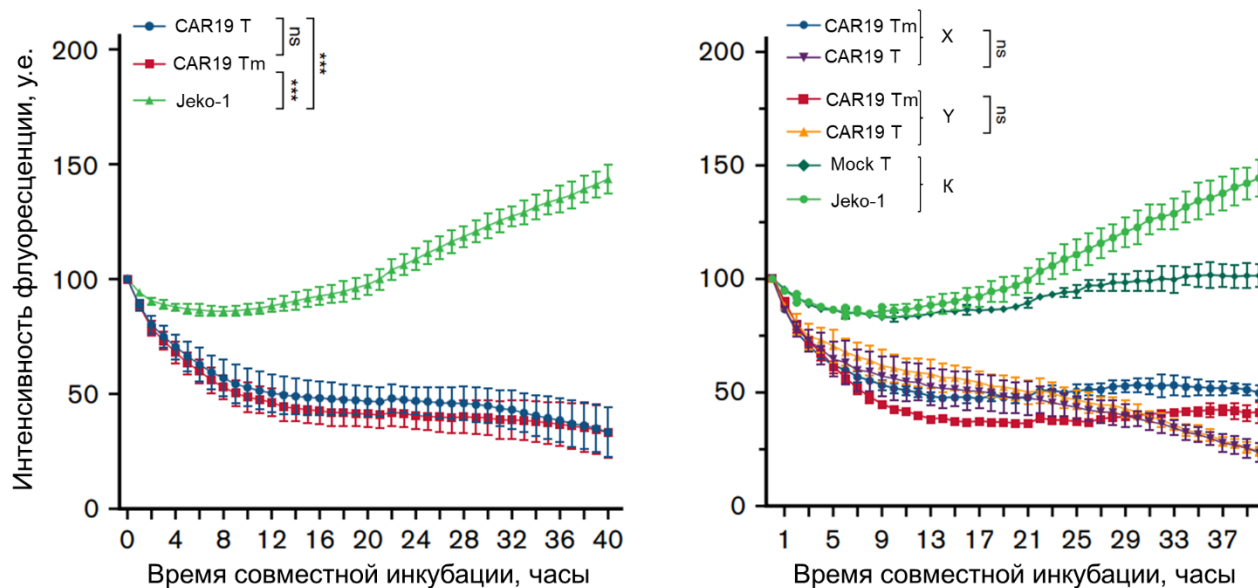


Рисунок 4.43 Динамический анализ цитолиза опухолевых клеток Jeko-1 CAR19 Tm и CAR19 T клетками. Эффективность лизиса определяется изменением интенсивности флуоресцентного сигнала опухолевых клеток с течением времени на приборе IncuCyte. X, Y – разные пациенты; K – контроли.

Однако, при проведении стресс-теста (sequential killing), в котором изначально популяцию CAR T клеток тестируют на способность многократно лизировать опухолевые клетки в течение продолжительного времени, CAR19 Tm клетки раньше теряют цитотоксическую активность (**Рис. 4.44**). Несмотря на то, что лимфоциты быстрее теряют способность к цитолизу опухолевых клеток (12-15 день) CAR19 Tm клетки оказались эффективными при введении пациентам.

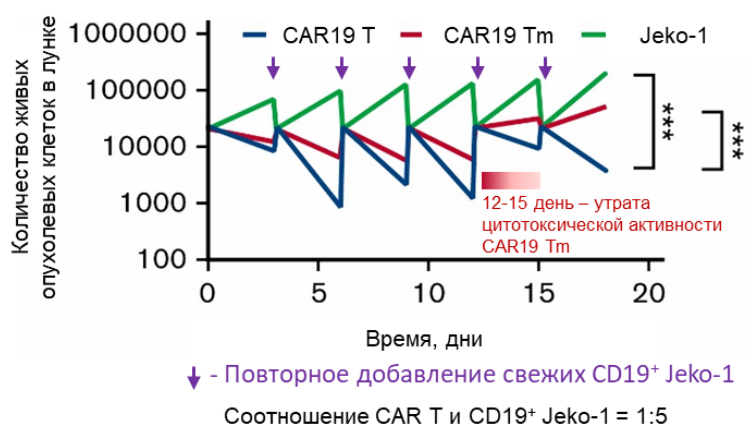


Рисунок 4.44 CAR19 Tm клетки раньше теряют цитотоксическую активность при многократном добавлении опухолевых клеток. К CAR19 Tm и CAR19 T клеткам добавляли новые клетки Jeko-1 каждые три дня. Количество опухолевых клеток и эффективность лизиса определяли с помощью проточной цитофлуориметрии.

Чтобы выяснить какие факторы обуславливают различия в функциональной активности между CAR19 Tm и CAR19 T клетками был проведен анализ транскриптома

полученных клеточных продуктов (**Рис. 4.45**). Анализ полученных данных показал, что CAR19 Tm клетки демонстрируют существенные различия с CAR19 Т клетками в отношении профиля экспрессии маркеров дифференцировки Т-лимфоцитов, таких как LEF1, TCF7, CD86, CD38 и IRF8. CAR19 Tm клетки обладают набором маркеров, характерным для более дифференцированных клеток, при этом уровень мРНК транскрипционного фактора TCF7 в них минимален. Недавно проведенные исследования показали, что TCF7 является ключевым фактором, определяющим функциональную активность CAR Т клеток и их терапевтический потенциал [383, 384]. Также, CAR19 Tm клетки демонстрируют повышенную экспрессию мРНК интерлейкинов семейства ИЛ-2 (ИЛ-4, ИЛ-15, ИЛ-21 и др.) и маркеров истощения Т клеток (CTLA-4, TIGIT, KLRB1 и др.), дополняя ранее полученные сведения о маркерах истощения. В совокупности, результаты сравнительного анализа транскриптома свидетельствуют о том, что CAR19 Tm клетки обладают более выраженными признаками истощения и дифференцировки, по сравнению с CAR19 Т клетками, и одновременно экспрессируют меньший набор маркеров, ассоциированных с более высоким терапевтическим потенциалом. Вероятно, это обусловлено тем, что CAR19 Tm лимфоциты, по своей природе, представлены ограниченным количеством популяций, состоящих преимущественно из клеток памяти, среди которых доминируют T_E лимфоциты.

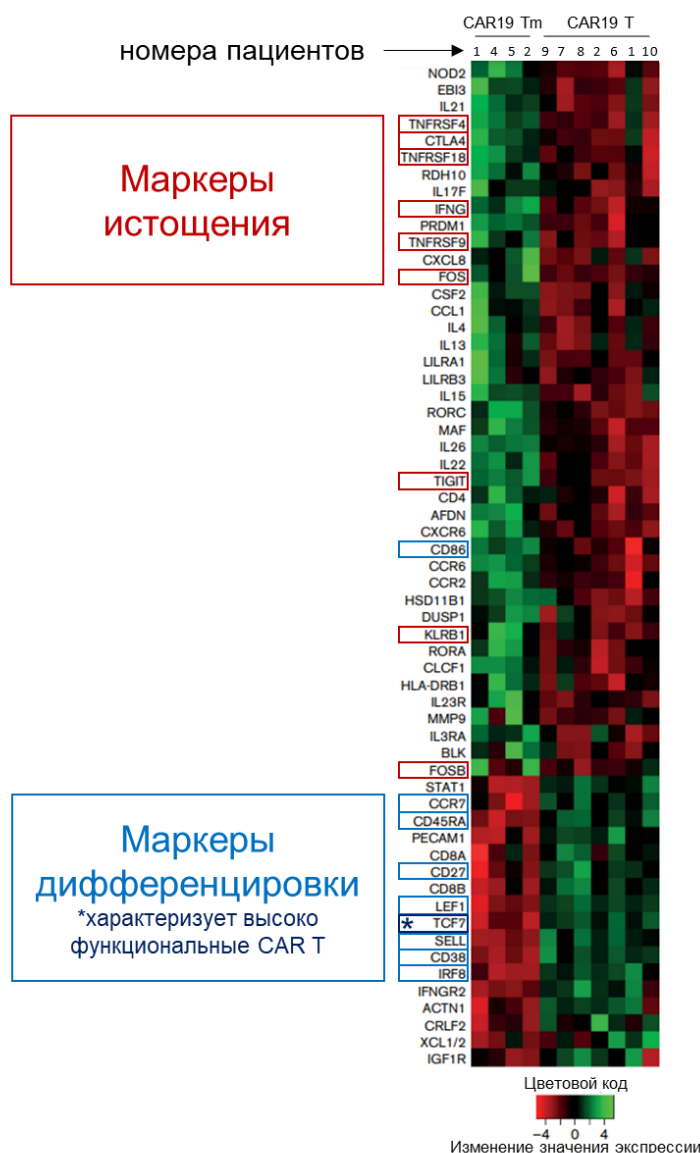


Рисунок 4.45 Уровни экспрессии генов в продуктах CAR19 Tm и CAR19 T клеток перед введением пациентам.

В результате, было установлено, что аллогенные CAR19 Tm клетки, полученные от доноров с идентичными гаплотипами, успешно убивают опухолевые клетки у пациентов с В-ОЛЛ без возникновения РТПХ и других серьезных побочных реакций. Также было показано, что CAR19 Tm клетки обладают таким же уровнем цитотоксичности, как и CAR19 T клетки, и активируются похоже на классические CAR19 T клетки. Тем не менее, из-за повышенной экспрессии генов, определяющих функциональное истощение и дифференцировку, их действие ограничено во времени. Для успешного клинического применения, вероятно, целесообразно либо повторное введение препарата, либо увеличение количества вводимых CAR Tm клеток. По результатам выполненной работы были опубликованы статьи в журналах *Blood Advances* [385] и *Leukemia* [176], а также

успешно защищена кандидатская диссертация Волкова Дмитрия Васильевича [380], в которой автор диссертации выступал в качестве научного руководителя.

4.3.3 *Использование автоматизированных закрытых систем для децентрализованного производства CAR T клеточного продукта.*

Описанные выше технологии создания бы невозможны без локализованного производства модифицированных лимфоцитов. Такая система называется децентрализованной моделью получения CAR T клеток и позволяет получить клеточный продукт с учетом индивидуальных особенностей течения заболевания каждого пациента или для исследования терапевтического потенциала нового CAR. Особенно важно, что это существенно ускоряет производство CAR T клеток для пациента и обеспечивает большую свободу научных центров и медицинских учреждений, занимающихся Т-клеточной терапией. В недалеком прошлом все децентрализованные испытания проводили, используя открытые системы. Это подразумевает поддержание максимально стерильных условий, но при этом многие этапы процесса, включая производство БМКП, выполняли вручную люди - высококвалифицированные клеточные технологи. Прогресс в создании биореакторов для производства CAR T-клеток и других биопрепаратов привел к резкому увеличению числа центров, использующих децентрализованную модель производства. Автоматизированные закрытые системы CliniMACS Prodigy© (Miltenyi Biotec) позволяют сократить площадь чистых помещений, необходимых для производства, а также минимизировать персонал, создающий новые или уже одобренные CAR T-продукты. Данная часть работы посвящена первому клиническому применению системы CliniMACS Prodigy© в рамках сотрудничества компании Miltenyi Biotec, национального медицинского исследовательского центра 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).

Для создания химерного антигенного рецептора специфичного к CD19 (далее CAR19) была получена генетическая конструкция кодирующая scFv анти-CD19 антитела (клон FMC63), CD8a шарнирный домен, трансмембранный домен TNFSRF19 и внутриклеточный сигнальные домены рецепторов 4-1BB и CD3z (**Рис. 4.46 А**). Данные модификации в дизайне CAR19 были необходимы для преодоления обширных правовых ограничений, созданных компанией Novartis для защиты интеллектуальной собственности продукта Kymriah (CAR19.8). Сравнительный анализ трансдуцированных Т клеток показал, что новый трансмембранный домен не изменяет эффективность экспрессии CAR19 (**Рис.**

4.46 Б). Также, анализ цитотоксичности CAR T клеток в отношении линий лимфомы Беркитта (Raji) и острого лимфобластного лейкоза (Reh) не обнаружил разницы между CAR19 и CAR19.8 T клетками (**Рис. 4.46 В**). В свою очередь, в ксеногенной модели лимфомы Беркитта, введение CAR19 T клеток мышам линии NSG с привитыми опухолевыми клетками Raji показало большую эффективность по сравнению с CAR19.8 T клетками (**Рис. 4.46 Г**).

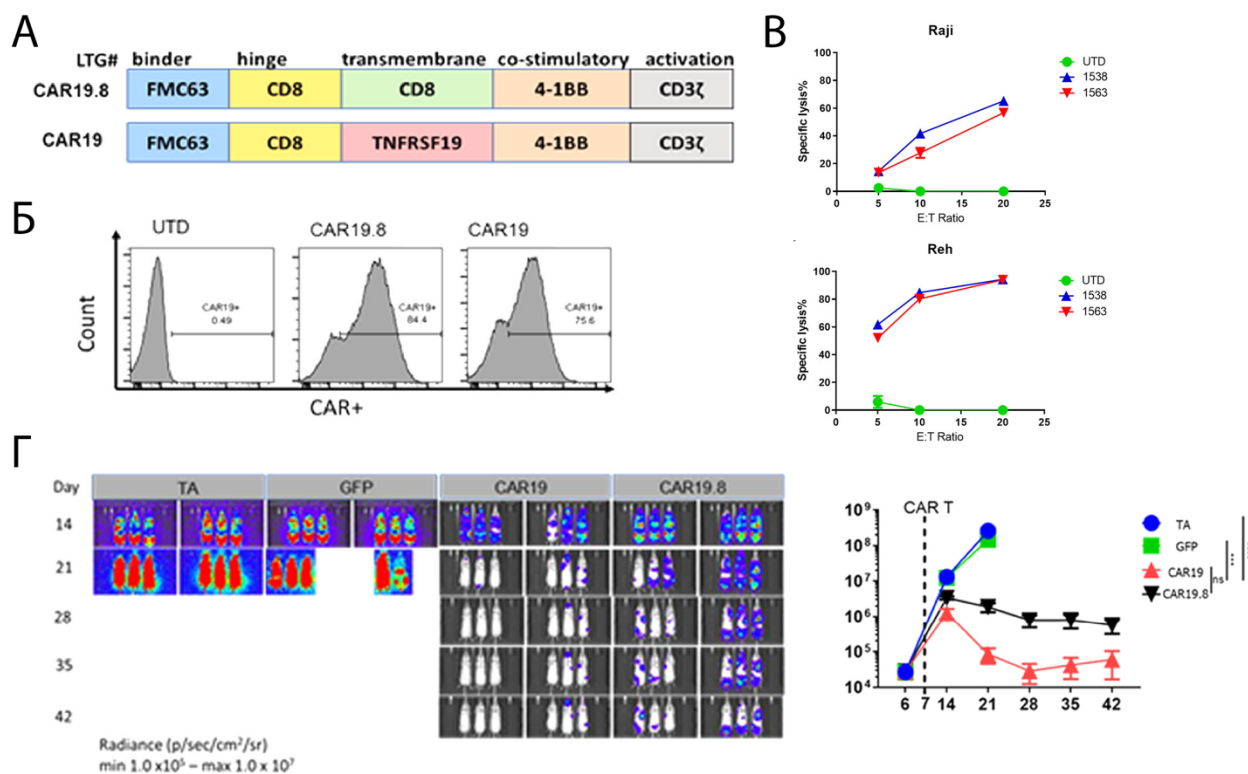


Рисунок 4.46 Создание генетических конструкций CAR19 и анализ противоопухолевой активности клеток *in vitro* и *in vivo*. А) Схема строения CAR19 и CAR19.8. FMC63 – одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела к CD19; CD8 шарнирная область; CD8 или TNFRSF19 – трансмембранный домен CD8 или члена суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 19; 4-1BB – сигнальный домен CD137; CD3 ζ – внутриклеточная часть человеческого CD3 ζ . Б) Цитофлуориметрический анализ экспрессии CAR19 и CAR19.8 T клетками после лентивирусной трансдукции. В) Анализ цитотоксичности CAR19 и CAR19.8 T клеток в отношении опухолевых клеточных линий Raji и Reh. Г) Сравнительный анализ эффективности CAR19 и CAR19.8 T клеток *in vivo*. Мышам линии NSG внутривенно вводили 0.5 млн. клеток Raji-Luc. Через 7 дней животным вводили 5 млн контрольные GFP трансдуцированные, CAR19 или CAR19.8 T клетки. Анализ опухолевой нагрузки с течением времени определяли методом биолуминесцентной визуализации.

После подтверждения эффективности CAR19 произведенных с помощью системы CliniMACS Prodigy были начаты клинические испытания с целью показать высокую эффективность децентрализованной модели производства CAR T клеток. Со стороны национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева в исследовании были включены тридцать один детский пациент с рецидивирующей рефрактерной (n=28) или первичной рефрактерной (n=3) ОЛЛ. В свою очередь, в Онкологическом центре Университетских госпиталей имени

Сейдмана были рекрутированы 23 взрослых пациента с рецидивирующей/рефрактерной лимфомой. Параллельно с этим 23 пациента с рецидивирующей/рефрактерной лимфомой у взрослых были включены в исследование в Онкологическом центре Сейдмана Университетской больницы, Кливленд, США. Все включенные в исследование пациенты дали информированное согласие на участие в клиническом исследовании и сопутствующем исследовании. Информация об испытаниях и характеристики пациентов доступны по адресу clinicaltrials.gov (NCT03467256 и NCT03434769). Доля успешной продукции CAR T клеток оказалась высокой и составила 96% (n=30) и 100% в Московской и Кливлендской когорте соответственно. Эффективность трансдукции в среднем составила 60% CAR-трансдуцированных Т-лимфоцитов в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, в то время как в Кливленде медиана составила 48%.

В итоге в исследование эффективности CAR19 Т клеток для терапии ОЛЛ было включено 27 пациентов. Уже на 28-й день после начала терапии у 89% из них достигнут полный клиренс лейкоза, что свидетельствует о высокой эффективности локализованного производства CAR Т клеток. Кроме того, за год общая выживаемость составила примерно в 68% случаев, что значительно превосходит показатели при рецидивирующем или рефрактерном заболевании. Эти результаты показывают, что CAR19 Т клетки могут стать важным средством для достижения ремиссии у пациентов с тяжелыми формами ОЛЛ (**Рис. 4.47 А**). В исследовании эффективности CAR19 Т клеток при терапии НХЛ участвовало 22 пациента. У 16 из них (около 70%) был зафиксирован положительный ответ — частичный или полный. Общая выживаемость за год составила примерно 78%, что также демонстрирует высокую эффективность терапии. Однако стоит отметить, что у некоторых пациентов наблюдались тяжелые побочные реакции, связанные с высокой опухолевой нагрузкой и активностью иммунной системы (**Рис. 4.47 Б**). Токсические эффекты при использовании CAR19 Т клеток включали цитокиновый синдром (ЦС), реакции центральной нервной системы (ЦНС) и гематологические нарушения. Цитокиновый синдром проявлялся лихорадкой, гипотонией и другими системными симптомами и был связан с высвобождением цитокинов при активации Т-лимфоцитов. Реакции ЦНС включали спутанность сознания, судороги и другие неврологические симптомы. Гематологические нарушения проявлялись в виде тромбоцитопении и нейтропении. Эти побочные эффекты чаще всего возникали у пациентов с высокой опухолевой нагрузкой. Для снижения риска тяжелых реакций использовалось профилактическое введение тоцилизумаба — моноклонального антитела против интерлейкина-6 — как до, так и после терапии CAR19 Т клетками. Это позволяло контролировать цитокиновый синдром и уменьшать необходимость в интенсивной поддерживающей терапии.

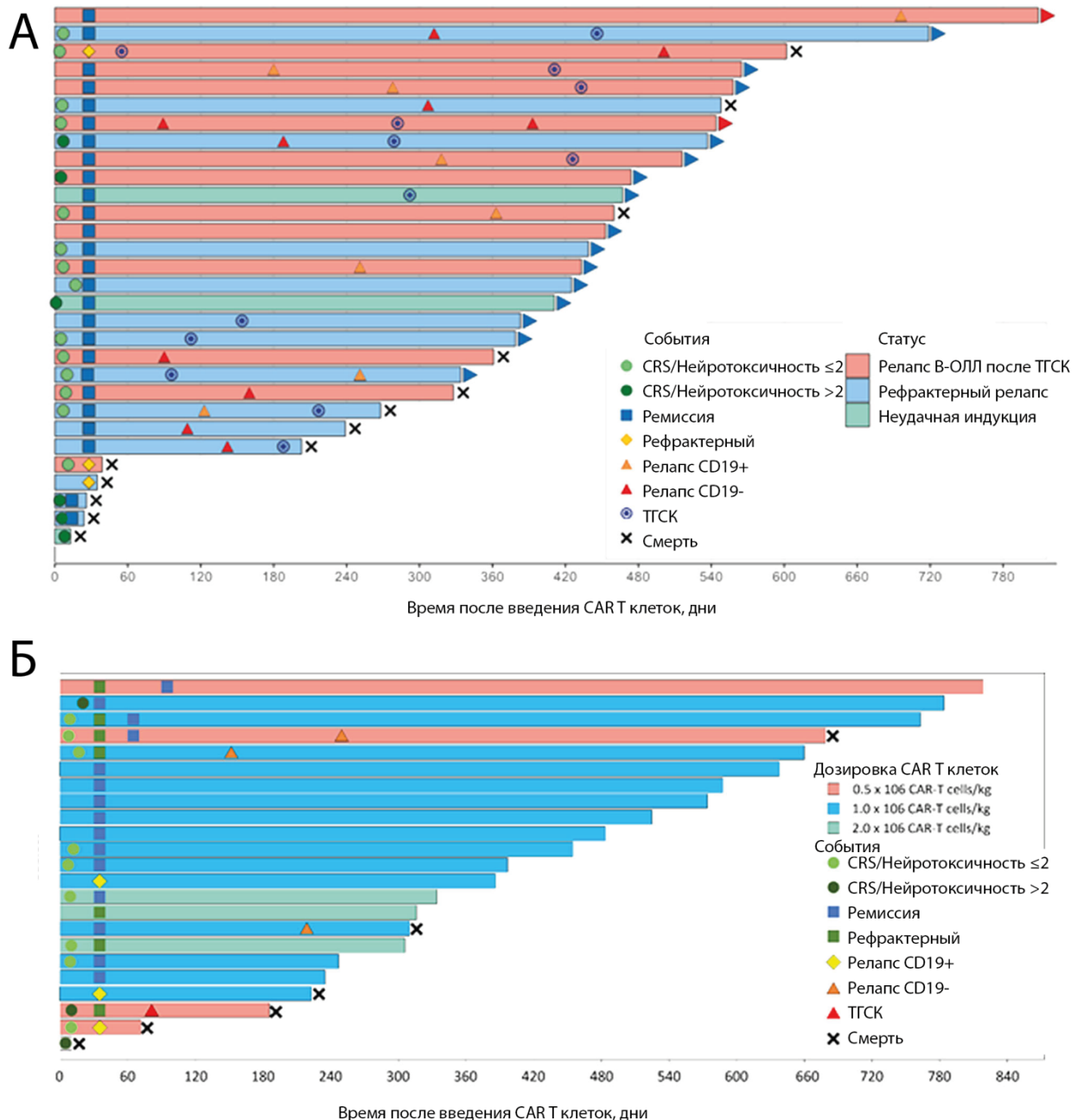


Рисунок 4.47 Эффективность CAR19 T клеток при терапии детского острого лимфобластного лейкоза и лимфомы взрослых пациентов. А) Для пациентов с ОЛЛ ($n = 31$): Горизонтальные полосы соответствуют каждому отдельному пациенту. Цвет полосы обозначает тип показания: Розовый — рецидив ALL после трансплантации костного мозга (HSCT). Голубой — рефрактерный рецидив. Зеленый — неудача индукционной терапии. Синие квадраты показывают полную ремиссию на 28-й день. Желтые ромбы — сохраняющееся заболевание на 28-й день. Светло-зеленый круг — наличие цитокинового синдрома (CRS) или нейроинфекционного синдрома степени ≤ 2 . Темно-зеленый круг — CRS или нейротоксичность степени > 2 . Оранжевый треугольник — рецидив, положительный по CD19. Красный треугольник — рецидив, положительный по CD19. Черный крест — смерть. Б) Для пациентов с неходжкинской лимфомой (NHL, $n = 23$): Горизонтальные полосы соответствуют каждому пациенту. Цвет полосы обозначает уровень дозировки: розовый — $0,5 \times 10^6$ CAR T клеток/кг, голубой — $1,0 \times 10^6$ CAR T клеток/кг, зеленый — $1,0 \times 10^6$ CAR T клеток/кг. Синие квадраты показывают полное метаболическое ответствие, определенное по ПЭТ/КТ. Зеленые квадраты — частичное метаболическое ответствие по ПЭТ/КТ. Желтые ромбы указывают на рефрактерное или сохраняющееся заболевание по данным ПЭТ/КТ. Светло-зеленый круг — CRS или нейротоксичность степени ≤ 2 . Темно-зеленый круг — CRS или ICANS степени > 2 . Оранжевый

треугольник — рецидив, положительный по CD19. Красный треугольник — рецидив, отрицательный по CD19. Черный крест — гибель пациента.

В целом, результаты показывают, что децентрализованное производство CAR19 Т клеток являются эффективным подходом для терапии рецидивирующих и рефрактерных форм ОЛЛ и НХЛ. Высокая CAR19 Т клеток эффективность сочетается с управляемым профилем безопасности при правильном мониторинге и профилактике побочных эффектов. В будущем ожидается дальнейшее развитие этой области, включая улучшение методов предсказания реакции и снижение токсичности, что сделает терапию еще более доступной и безопасной для широкого круга пациентов. По результатам выполненной работы была опубликована статья в журнале *Nature Communications* [43].

4.4 Изучение влияния факторов микроокружения опухоли на противоопухолевую активность CAR Т клеток

4.4.1 Блокирование выхода PD-1 на поверхность CAR Т клеток усиливает их активацию и снижает выживаемость

Опухолевое микроокружение, обладающее иммуносупрессивными свойствами, создает серьезные препятствия для разработки новых терапевтических стратегий, основанных на адоптивной иммунотерапии, и CAR Т терапия – не исключение. Активация и цитотоксичность Т 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. К их числу можно отнести и CAR Т клетки, испытавшие действие опухолевого микроокружения. Поэтому разобщение взаимодействия PD-1/PD-L1, либо CTLA-4 с CD80/CD86 с помощью моноклональных антител позволяет в части пациентов восстановить активность противоопухолевых Т лимфоцитов. Однако, применение антител к контрольным иммунным точкам осложнено низкой биодоступностью стромы большинства солидных опухолей для иммуноглобулинов. С другой стороны, схожего эффекта можно добиться путем нокаута гена PD-1 в Т-клетках, подавления его транскрипции, а также путем целенаправленной деградции мРНК PD-1 с помощью РНК-интерференции. 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. В отличие от работ, в которых CAR Т клетки секретируют анти-PD-1 и анти-PD-L1 антитела, в данной работе был использован подход внутриклеточного “захвата и удержания” PD-1, препятствующих его выходу на

поверхность Т клетки. Последовательность анти-PD-1 VHH 102с2 антитела альпаки была любезно предоставлена Степаном Чумаковым, старшим научным сотрудником лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН. К гену, кодирующему анти-PD-1 антитело VHH, добавили последовательность короткого линкера и мотив PEBL (protein expression blockers; [386]). 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).

Последовательность анти-PD-1 VHH-PEBL (aPD-1-PEBL) была включена в состав химерного антигенного рецептора CAR19 через само-отщепляющийся пептид P2A (**Рис. 4.48 А**). Итоговая лентивирусная генетическая рLV2 CAR19-P2A-aPD1-PEBL позволяет Т клеткам одновременно экспонировать на поверхности CAR19 и синтезировать внутриклеточный блокатор PD-1.

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 **4.48 Б**, 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. 4.48 Б**).

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. Данные клетки позволяют определить степень активации Jurkat Т клеток, поскольку их стимуляция через CAR должна активировать сигнальные каскады, приводящие к активации NFAT, который, в свою очередь, должен активировать транскрипцию гена секретируемой люциферазы, ферментативную активность которой можно количественно измерить в образце среды, в которой находятся репортерные клетки (**Рис. 4.48 В**). В качестве мишеней были использованы CD19-положительные линии Nalm-6 и Nalm-6-PD-L1, экспрессирующие PD-L1. Анализ люциферазной активности через 48 часов ко-инкубации показал, что в отсутствие CAR19, активации клеток Jurkat и Jurkat-PD-1 при смешивании с Nalm-6 и Nalm-6-PD-L1 не происходит. 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. 4.48 В, правая часть**). Таким образом, созданная репортерная система показала специфическое подавление активирующего сигнала от CAR по PD-1/PD-L1-зависимому пути. В свою очередь, при трансдукции лентивирусами CAR19-P2A-aPD1-

PEBL клеток Jurkat или Jurkat PD-1, активация полученных клеток в присутствии Nalm-6 и Nalm-6-PD-L1 была примерно одинакова. Результаты данного эксперимента показали, что внутриклеточное блокирование PD-1 позволяет преодолеть ингибирование сигнала, передаваемого через CAR, вызванного взаимодействием PD-1 с PD-L1.

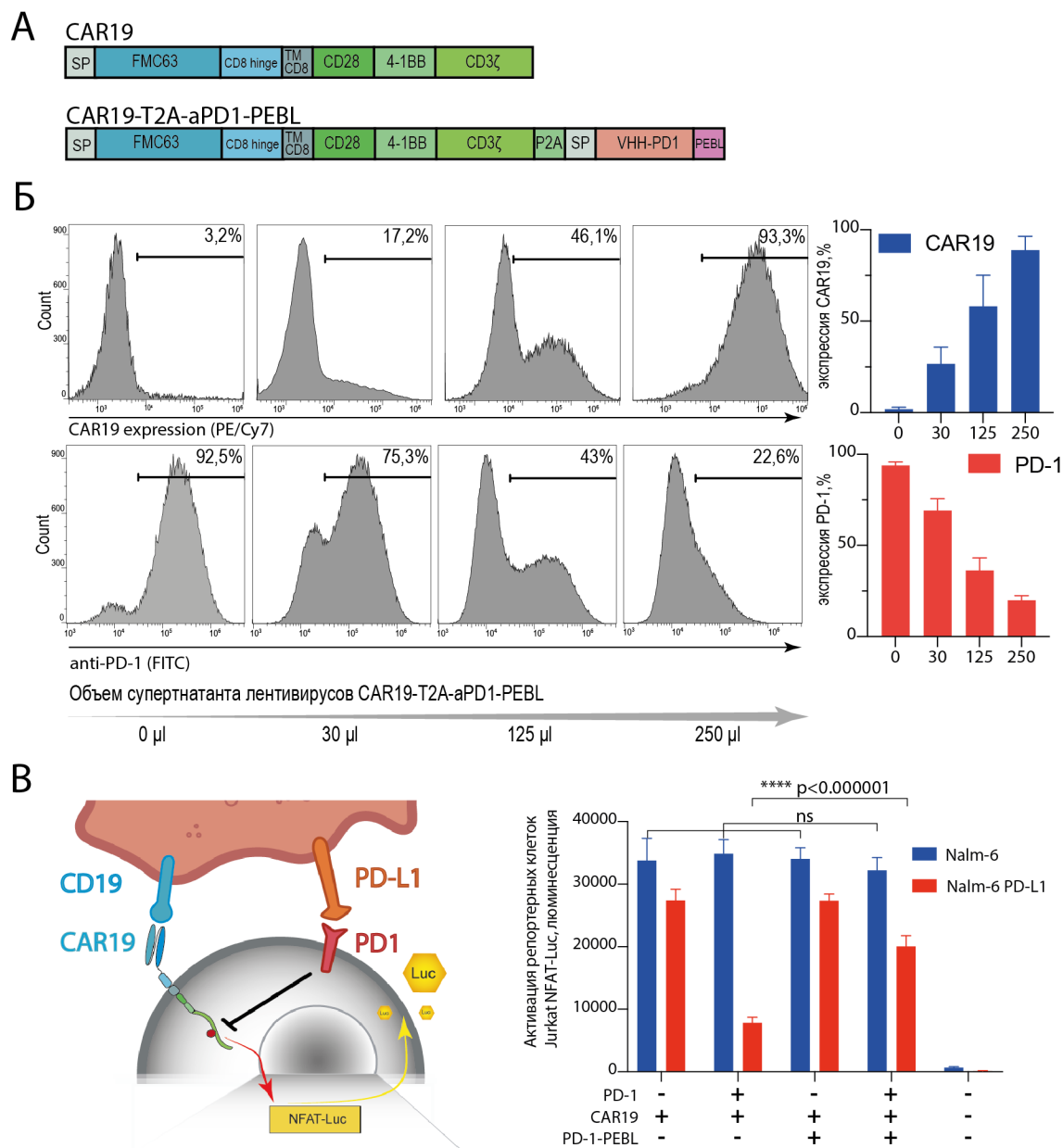


Рисунок 4.48 Получение и функциональный анализ конструкции CAR19-P2A-aPD-1-PEBL.

А) Схема лентивирусных конструкций CAR19 и CAR19-P2A-aPD-1-PEBL, где SP – это сигнальный пептид, FMC63 – scFv антитела к CD19, CD8 hinge – шарнирный линкер CD8α, TM – трансмембранный домен, 4-1BB – цитоплазматический домен активации CD137, CD3ζ – цитоплазматический домен активации CD3-дзета. Б) Цитофлуориметрический анализ экспрессии CAR19 и PD-1 клетками Jurkat-PD-1 после трансдукции разными количествами лентивирусного супернатанта CAR19-P2A-aPD-1-PEBL. Через 72 ч после трансдукции вирусами CAR19-P2A-aPD-1-PEBL клетки были окрашены анти-CAR19 PE/Cy7 и анти-PD-1 FITC антителами. В) Репортерная клеточная система для оценки PD-1/PD-L взаимодействия на основе Jurkat NFAT Lucia™. 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. Все данные гистограмм – это средние значения ± стандартное

отклонение. Значения p определялись с помощью множественного t -критерия. Статистическая значимость: **** $p < 0,0001$

Эффективность конструкции CAR19-P2A-aPD1-PEBL на Т клетках человека была подтверждена следующим образом. Т клетки периферической крови здорового донора были активированы и трансдуцированы CAR19 и CAR19-P2A-aPD1-PEBL. Цитофлуориметрический анализ показал, что Т клетки CD19 CAR-P2A-aPD-1-PEBL демонстрируют пониженный уровень PD-1 по сравнению с контрольными CAR19 Т клетками (Рис. 4.49). Чтобы оценить потенциал внутриклеточного блокирования PD-1 для реактивации или уменьшения функционального истощения Т клеток был проведен продолжительный тест на цитотоксичность различных CAR Т клеток, отличающихся поверхностным уровнем PD-1.

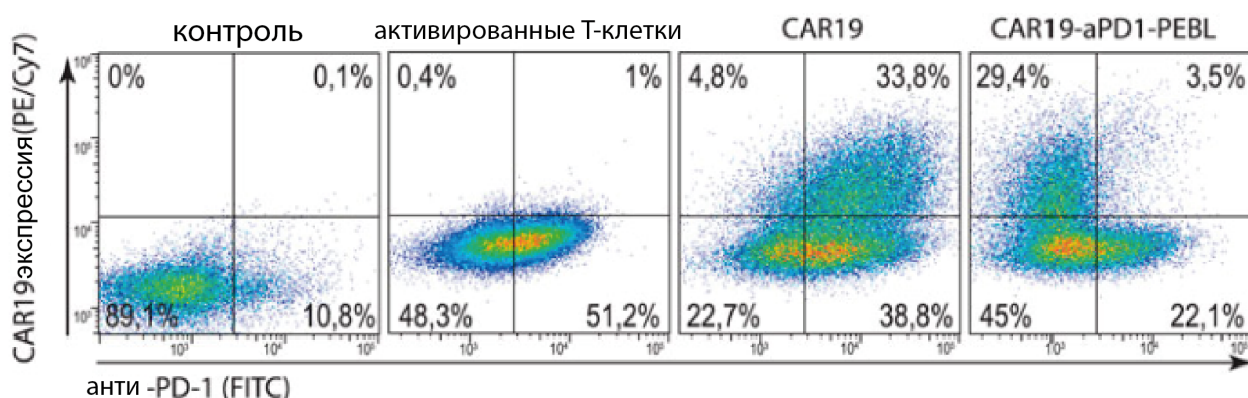


Рисунок 4.49 Цитофлуориметрический анализ экспрессии PD-1 CAR Т клетками человека, трансдуцированными CAR19 и CAR19-P2A-aPD-1-PEBL.

Как уже упоминалось ранее, тест, получивший в англоязычных изданиях название “sequential killing”, позволяет определить как долго исследуемые CAR Т клетки сохраняют цитотоксичность в условиях постоянного возобновления числа клеток-мишеней в смешанной культуре. Сравнительный анализ CAR19-P2A-aPD-1-PEBL и CAR19 Т клеток показал сходную цитотоксическую активность в первые дни эксперимента (при уничтожении клеток линий Nalm-6 и Nalm-6 PD-L1). Однако, при последовательном добавлении новых клеток-мишеней CAR19-P2A-aPD-1-PEBL Т клетки быстрее теряли цитотоксичность (Рис. 4.50 А). Для изучения причин ускоренного истощения CAR Т клеток на 9 день с начала стресс-теста был проведен анализ экспрессии маркеров дифференцировки, а также маркеров истощения Т клеток. Проточная цитофлуориметрия показала, что популяции CAR Т клеток с низким уровнем экспрессии PD-1 обогащена терминально дифференцированными клетками (Рис. 4.50 Б). 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. 4.50 В**). 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 Т клеток.

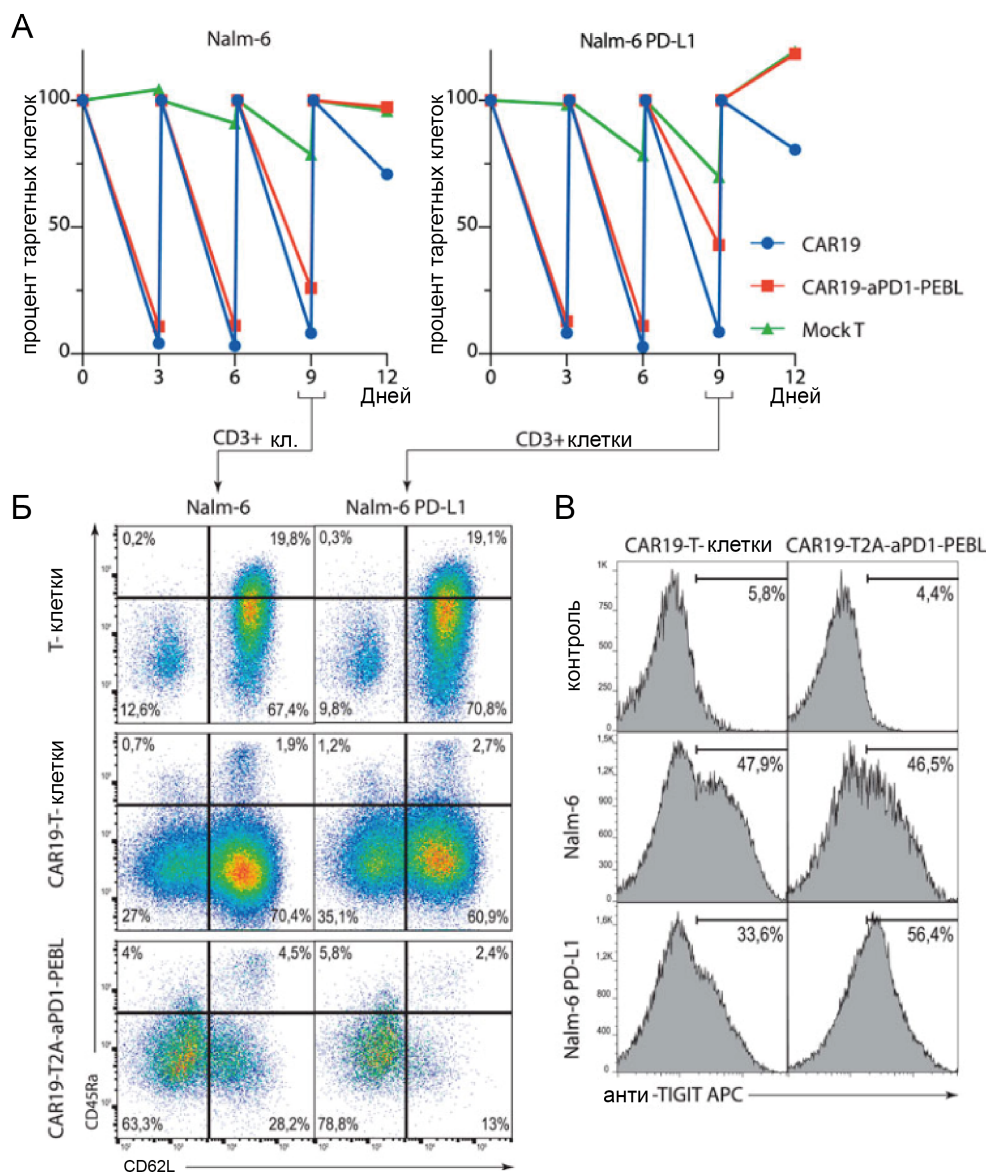


Рисунок 4.50 Внутриклеточное блокирование PD-1 в CAR T клетках приводит к повышенной активации и раннему истощению. А) Цитотоксический стресс-тест CAR19 или CAR19-P2A-aPD-1-PEBL Т клеток в отношении Nalm-6 и Nalm-6 PD-L1. Соотношение Е:Т 1:4, суммарная длительность эксперимента 12 дней. Б) Фенотип CAR19 и CAR19-P2A-aPD-1-PEBL Т клеток на 9-й день стресс-теста из А). В) Экспрессия TIGIT CAR19 и CAR19-P2A-aPD-1-PEBL Т клетками на 9-й день стресс-теста.

Согласно полученным результатам, было выяснено, что удаление PD-1 с поверхности CAR Т клеток, вопреки ожиданиям, вызывает повышенную активацию, быстрое созревание и функциональное истощение Т клеток, которое приводит к снижению продолжительности цитотоксичности CAR Т клеток.

Ранее уже были опубликованы работы, в которых было показано, что CAR T клетки с терминально дифференцированным фенотипом и повышенным уровнем поверхностных маркеров истощения обладают пониженной цитотоксичностью [387]. Более того, подавление экспрессии PD-1 с помощью shRNA [306] или нокаут гена PDCD1 [305] приводит к ускоренному истощению функции 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*. По результатам выполненной работы опубликована статья в журнале *Frontiers in Molecular Biosciences* [388], а также успешно защищена кандидатская диссертация Калинина Романа Сергеевича, в которой автор диссертации выступал в качестве научного руководителя [335].

Несмотря на то, что изначальная идея состояла в создании CAR T клеток, устойчивых к ингибированию PD-L1, полученные результаты оказались востребованы научным сообществом и многократно процитированы во многих публикациях в самых престижных рецензируемых журналах, в числе которых *Immunity*, *Nature Immunology*, *Nature Cancer*, *Nature Communications*, *Cancer Discovery*, *Molecular Therapy* и др.

4.4.2 Изучение влияния экзосом EV на противоопухолевую активность CAR T-клеток

Внеклеточные везикулы, выделяемые опухолями, являются важным фактором микроокружения, поскольку негативно влияют на функции клеток иммунной системы, ингибируя противоопухолевый иммунитет. Молекулярные механизмы, определяющие связывание опухолевых везикул с T-лимфоцитами, а также эффект, который везикулы оказывают на T клетки, на сегодняшний день являются одной из наиболее интенсивно изучаемых областей онкоиммунологии [389-391]. 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. Поэтому результат такого взаимодействия везикул с T клетками может отличаться от изученных ранее иммуномодулирующих механизмов. 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*. Выделенные из культуры клеток Nalm-6 внеклеточные везикулы несут на поверхности набор белков, характерных для мембраны трансформированных патологических В-клеток при лимфобластном лейкозе. Мультиплексный анализ поверхностных маркеров, представленных на экзосомах выделенных из различных лимфомных линий, был проведен с помощью набора MACSPlex Exosome Kit (Miltenyi Biotec), который позволяет одновременно выявлять сразу 37 поверхностных антигенов. В результате, нами показано, что экзосомы, клеток Nalm-6 и Raji содержат характерные для экзосом белки: тетраспанины (CD9, CD81 и CD63), различные интегрины, молекулы МНС, а также основной антиген-мишень CAR T клеточной терапии CD19 (Рис. 4.51).

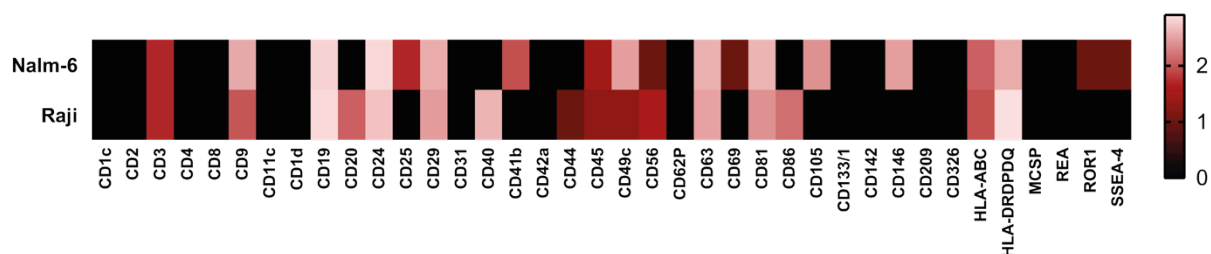


Рисунок 4.51 Мультиплексный анализ поверхностных маркеров, представленных на экзосомах различных лимфомных линий, представленный в виде тепловой карты относительных значений.

Для получения опухолевых везикул, которые можно использовать в качестве адекватного отрицательного контроля, с помощью технологии CRISPR/Cas9 в клетках Nalm-6 был произведен нокаут гена *CD19* (Рис. 4.51 А). В экзосомах (и других видах секретируемых везикул), выделяемых данными клетками должен отсутствовать CD19, что позволяет адекватно определить тропность опухолевых везикул к CAR19 Т клеткам. Для характеристики внеклеточных экзосом (с примесью других внеклеточных везикул, далее они будут называться экзосомами), выделяемых обычными клетками Nalm-6 была использована трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ), которая позволила визуализировать отдельные экзосомы, размер которых варьировал от 50 до 200 нм (Рис. 4.51 Б). Вестерн-блот анализ показал, что CD19 присутствует в экзосомах, выделенных из клеточной линии Nalm-6, но отсутствует в экстрактах экзосом, полученных от Nalm-6 CD19- (Рис. 4.51 В).

Для определения размеров и ряда других физических параметров экзосом был применен метод NTA (nanoparticle tracking analysis). Результаты анализа суспензий экзосом методом NTA показали, что средний размер везикул, полученных от линий Nalm-6 и Nalm-

6 CD19-, и их распределение по размерам очень похоже, средний размер близок к 100 нм. Если точнее, то он составил: $94,45 \pm 101,6$ нм для Nalm-6 CD19- и $101,1 \pm 108,3$ нм для Nalm-6 CD19+. Важно отметить, что концентрация везикул в образцах достаточно сильно отличалась: $2,6 \times 10^{11}$ частиц/мл для Nalm-6 CD19- и $14,7 \times 10^{11}$ частиц/мл для Nalm-6, что может быть связано с погрешностями при культивировании клеток и неточностью метода выделения экзосом. Подавляющее большинство везикул имели размеры в диапазоне от 50 до 150 нм (**Рис. 4.51 Г**). Для независимого подтверждения экспонирования маркера CD19 на экзосомах от обычных Nalm-6 и его отсутствия на экзосомах Nalm-6, внеклеточные везикулы были проинкубированы с полимерными шариками, несущими на поверхности антитела к CD81 для специфической сорбции внеклеточных везикул. Абсорбция экзосом на латексных наночастицах позволяет анализировать везикулы методом проточной цитометрии [392]. Цитофлуориметрический (**Рис. 4.51 Д**) анализ показал, что CD19 присутствует в экзосомах, выделенных из клеточной линии Nalm-6, но отсутствует на экзосомах, полученных от Nalm-6 CD19-, а экзосомы из клеток Nalm-6-PD-1 несли на поверхности PD-1.

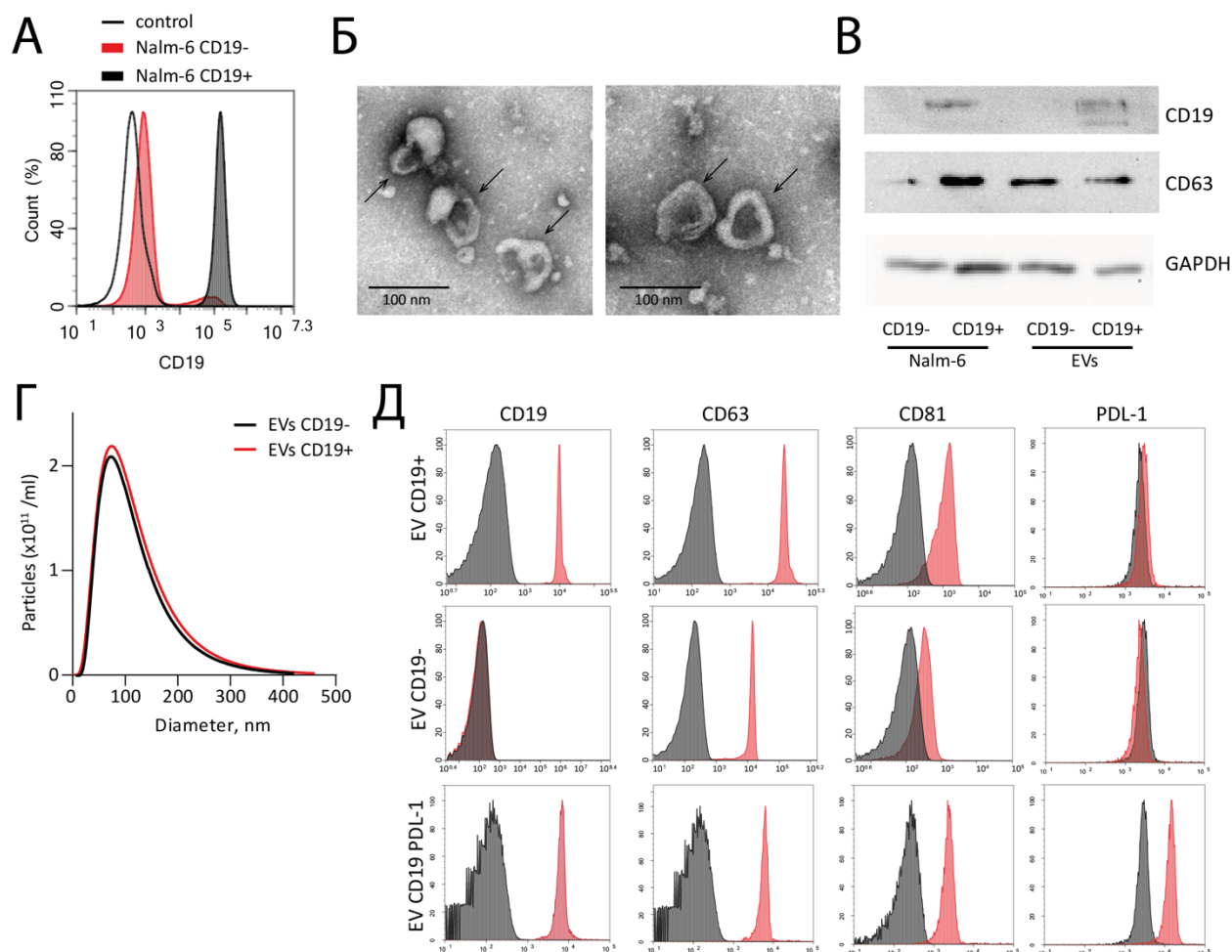


Рисунок 4.51 Количественная и качественная характеристика экзосом, выделенных из клеток Nalm-6, Nalm-6 CD19- и Nalm-6 PD-1. А) Эффективность нокаута гена CD19 в клетках Nalm-6. Б)

трансмиссионная электронная микроскопия экзосом. В) Вестерн-блот экзосом секретируемых клетками Nalm-6 и Nalm-6 CD19-. Г) NTA анализ распределения частиц по размерам и концентрация выделенных EV. Д) Анализ экспрессии CD19 и CD63 маркеров на поверхности экзосом, полученных из клеточных линий Nalm-6, Nalm-6 PD-1 и Nalm-6 CD19-.

Затем мы провели анализ опосредованной CD19 тропности опухолевых экзосом по отношению к CD19 CAR T клеткам. Для этого Mock или CAR19 T клетки были проинкубированы с опухолевыми везикулами и окрашены с применением антител специфичных к CD3 и CD19. Конфокальная микроскопия показала избирательное взаимодействие экзосом CD19+ и их поглощение клетками, экспрессирующими CAR19, но не контрольными Mock T клетками (**Рис. 4.52 А**). 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 T клетки (**Рис. 4.52 Б**).

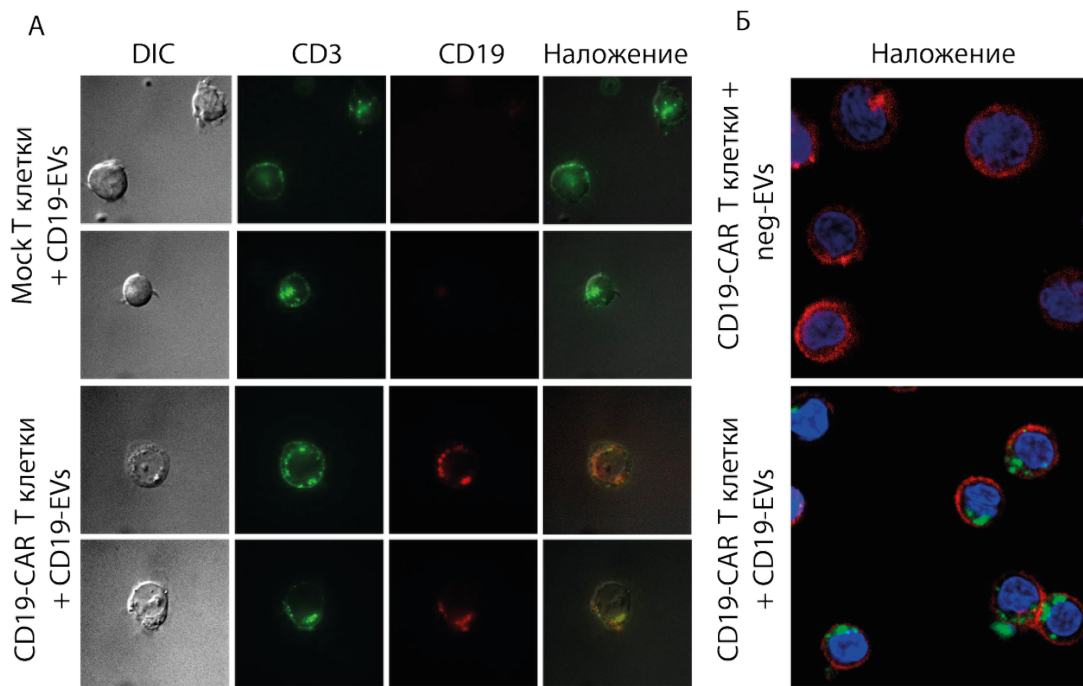


Рисунок 4.52 CAR T клетки антиген-зависимо связывают опухолевые экзосомы. А) Конфокальное изображение клеток Mock и CAR19 T клеток, инкубированных с экзосомами, секретируемыми клетками Nalm-6. (Красный - окрашивание антителами к CD19, зеленым – к CD3) Б) CAR19 T клетки связывают опухолевые экзосомы только при наличии CD19 (красный - CD3, зеленый – CD63-GFP, синий – ядро (Hoechst33342)).

Распознавание антигена на поверхности опухолевой клетки инициирует активацию CAR T клетки. Возможно, что взаимодействие с опухоль-ассоциированным антигеном на опухолевых экзосомах тоже является достаточным стимулом к активации химерного рецептора. И действительно, CD19 на поверхности экзосом клеток Nalm-6 приводит к

секреции провоспалительных цитокинов CAR19 Т клетками, что свидетельствует об их активации (**Рис. 4.53 А**), а также снижает цитотоксичность CAR19 Т клеток по отношению к клеткам-мишеням (**Рис. 4.53 Б**). 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. 4.53 В, 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. 4.53 Д**). Как и ожидалось, добавление CD19+ и CD19+PD-L1+ опухолевых экзосом приводило к быстрой потере функциональной активности CAR19 Т клеток.

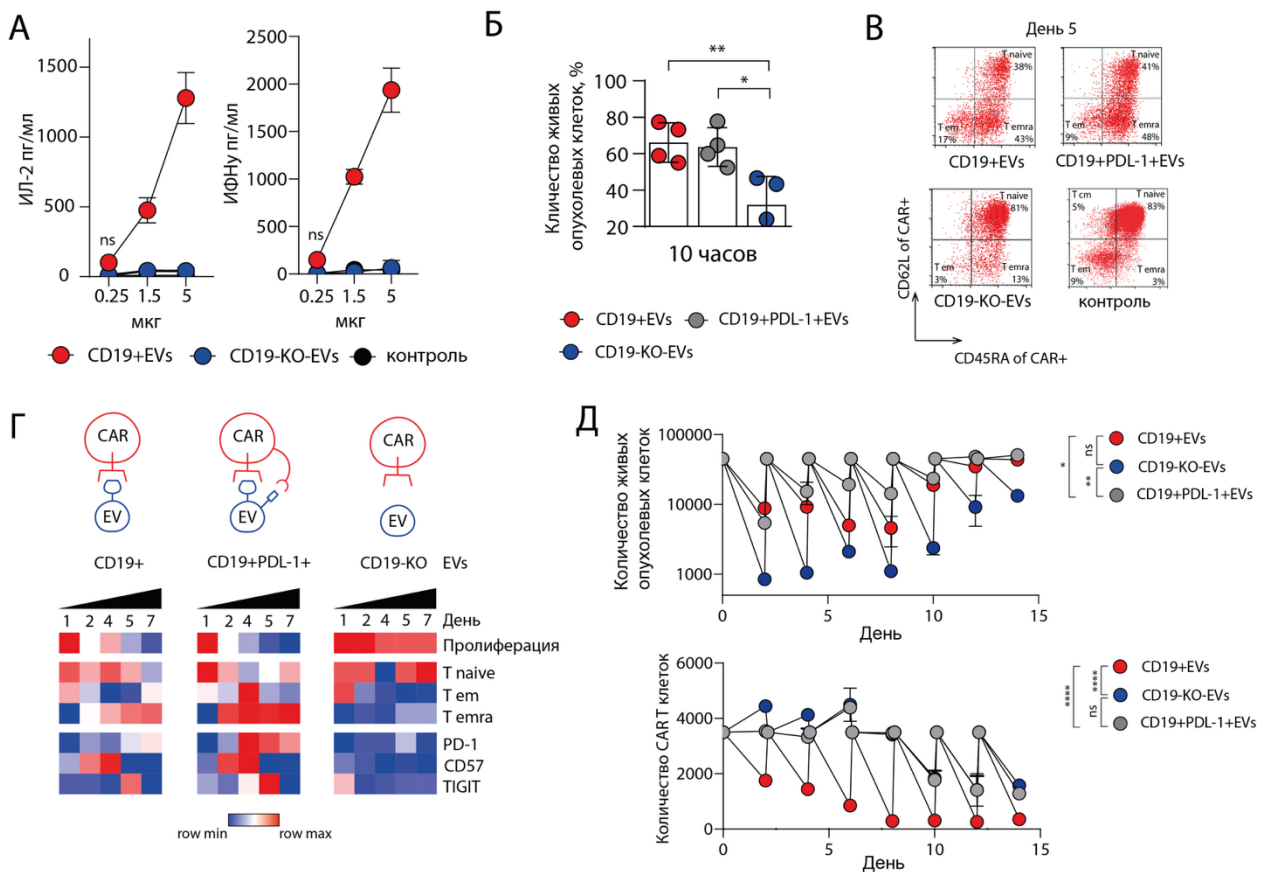


Рисунок 4.53. Влияние опухолевых экзосом на функциональную активность CAR Т клеток.

А) Секреция про-воспалительных цитокинов при взаимодействии CAR19 Т 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 Т клеток, предварительно обработанных CD19+EV, CD19+PD-L1+EV и CD19-KO-EVs. В) Анализ фенотипа CAR Т клеток через пять дней после добавления CD19+EV, CD19+PD-L1+EV и CD19-KO-EVs. Г) Анализ фенотипа и экспрессии маркеров истощения CAR Т 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 Т клеток.

Чтобы более детально изучить влияние опухолевых экзосом на CAR T клетки был проведен анализ транскриптома лимфоцитов, обработанных везикулами. Для этого был использован NanoString nCounter Gene Expression Assay, который основан на анализе паттерна мРНК с помощью целевых пар зондов, имеющих различную цветовую кодировку. Этот метод позволяет количественно определять экспрессию до 800 генов в одной реакции. Полученные данные подтвердили, что добавление CD19-положительных экзосом приводит к достоверному и значительному повышению экспрессии генов, регулирующих активацию T клеток (Рис. 4.54).

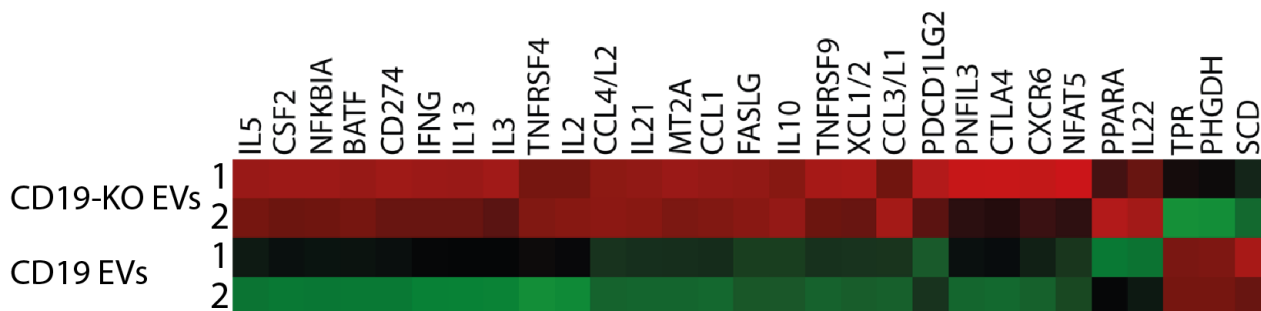


Рисунок 4.54 Анализ изменения транскриптома CAR19 T клеток, выделенных из двух доноров (1 и 2), проинкубированных с CD19+EVs и CD19-KO-EVs. Данные представлены в виде тепловой карты и отображают изменение экспрессии mRNA, выделенной из CAR T клеток. На тепловой карте представлены гены с $p < 0.05$.

Примечательно, что наряду с повышением экспрессии генов, прямо указывающих на активацию CAR T 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 T 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 T 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. По результатам выполненной работы опубликованы статьи в журналах *Scientific Reports* [393] и *Acta Naturae* [394], а также успешно защищена кандидатская диссертация Украинской Валерии Михайловны, в которой автор диссертации выступал в качестве научного руководителя [395].

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

Производство CAR T клеток включает этапы выделения T клеток, их активации, трансдукции CAR и последующей экспансией перед введением пациенту. Процесс размножения CAR T клеток в культуре напрямую влияет на популяционный состав и фенотип клеточного продукта. В некоторых случаях качество исходного клеточного материала пациента не позволяет получить CAR T клетки в достаточных количествах или процент CAR-положительных клеток оказывается невысоким. На сегодняшний день, при производстве клеточного продукта для активации T клеток используют цитокины и антитела специфичные к CD3 и CD28. Основными недостатками данных подходов является стимуляция всех клеток в культуре, а не только CAR T клеток, и сильные отличия в биомеханике активации рецепторов по сравнению с TCR. Альтернативным способом при экспансии CAR T клеток является использование фидерных клеток, несущих антиген CAR, которые позволяют стимулировать только CAR-положительные клетки и обеспечивают необходимые сигналы, поступающие в клетку. Однако, высокие требования к биобезопасности и контаминации клеточного продукта перед введением пациенту существенно затрудняют распространение применения фидерных клеток в клинической практике. 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 Зенковой М.А. была разработана методика получения искусственных везикул (artificial vesicles, AV), предполагающая обработку клеток цитохалазином В [396]. Цитохалазин В разрушает актиновый каркас клетки, что в свою очередь, вызывает экструзию ядра, отслоение плазматической мембраны и образование отпочковывающихся микроцитосфер из мембранных структур [397], которые освобождаются при встряхивании суспензии клеток. На поверхности микроцитосфер, должны располагаться белки, идентичные тем, которые присутствуют на мембране исходных клеток [398] (**Рис. 4.55**).

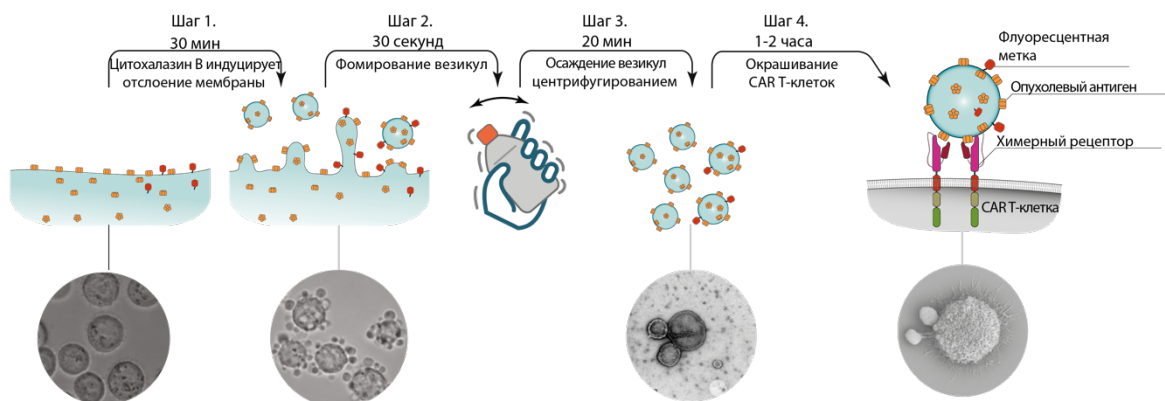


Рисунок 4.55 Схематическое изображение процесса получения искусственных везикул обработкой клеток цитохалазином В.

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 этого были созданы лентивирусные вектора, несущие кДНК выбранных нами антигенов, получены лентивирусные частицы, использованные для стабильной трансдукции клеток HeLa. Продукцию выбранных опухолевых поверхностных белков подтвердили с помощью окрашивания клеток конъюгатами моноклональных антител к соответствующим маркерам с флуоресцентными красителями и последующим анализом методом проточной цитофлуориметрии (**Рис. 4.56**).

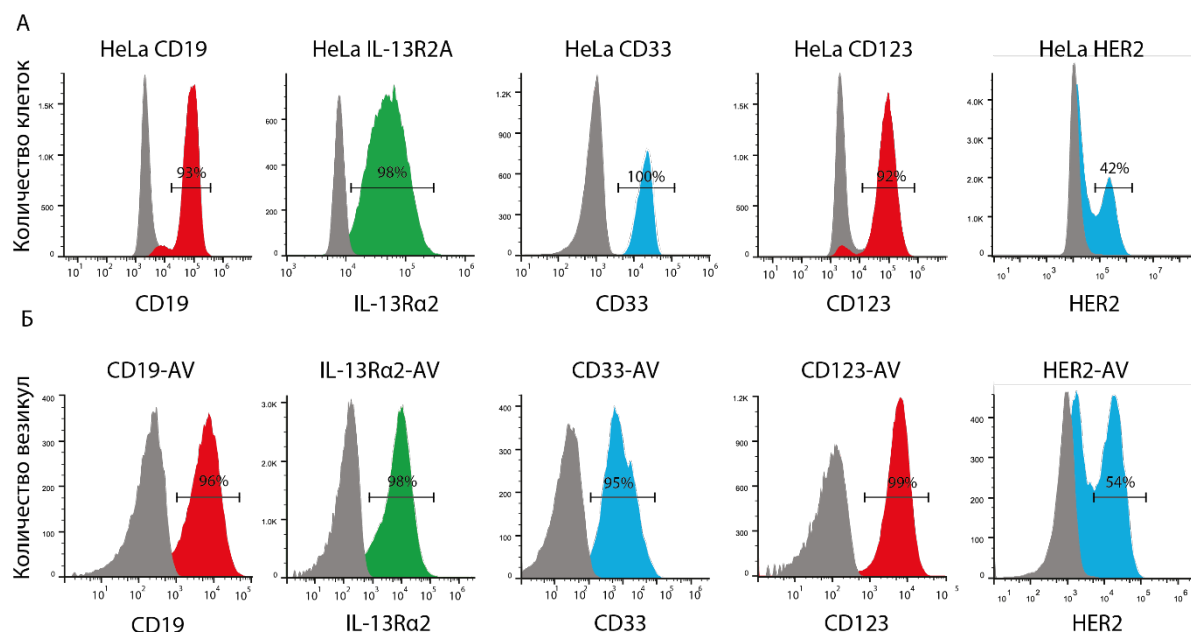


Рисунок 4.56 Получение панели клеточных линии HeLa, несущих опухоль-ассоциированные антигены, с последующим получением искусственных везикул. Гистограммы отображают результаты окрашивания клеточных линий HeLa и AV (в рисунках А и Б соответственно) антителами, специфичными к поверхностным антигенам. Для сравнения, серые гистограммы отображают результаты окрашивания клеток HeLa, которые не были трансдуцированы соответствующими конструкциями, а также AV, выделенных из супернатантов обычных клеток HeLa. Линиями обозначены проценты клеток в линиях HeLa и AV, экспрессирующих указанные антигены.

Для визуализации искусственных везикул по флуоресценции также были созданы стабильные клеточные линии, экспрессирующие флуоресцентный белок dTomato с трансмембранным якорем (dTomato-МТА). Визуализация каждого этапа формирования везикул осуществлялась с помощью конфокальной микроскопии. На изображениях отчетливо видно отслаивание цитоплазматической мембраны, приводящее к образованию микроцитосфер, которые затем отделялись от разрушенных клеток и их фрагментов при помощи центрифугирования (**Рис. 4.57 А**). Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) подтвердила сходство полученных изображений AV с описанными в научной литературе изображениями относительно крупных искусственных пузырьков [396] (**Рис. 4.57 Б**). Анализ изображений AV показал, что средний диаметр везикул составляет приблизительно 2400 нм. Проточная цитофлуориметрия показала, что из одной клетки HeLa можно извлечь около четырех AV (**Рис. 4.57 В**). Полученные везикулы оказались способными стимулировать CAR T клетки к секреции цитокинов (**Рис. 4.57 Г**). Эксперименты продемонстрировали, что AV сохраняют свою стабильность при температуре 4°C в течение двух суток и более длительного времени при -80°C в 10% растворе DMSO.

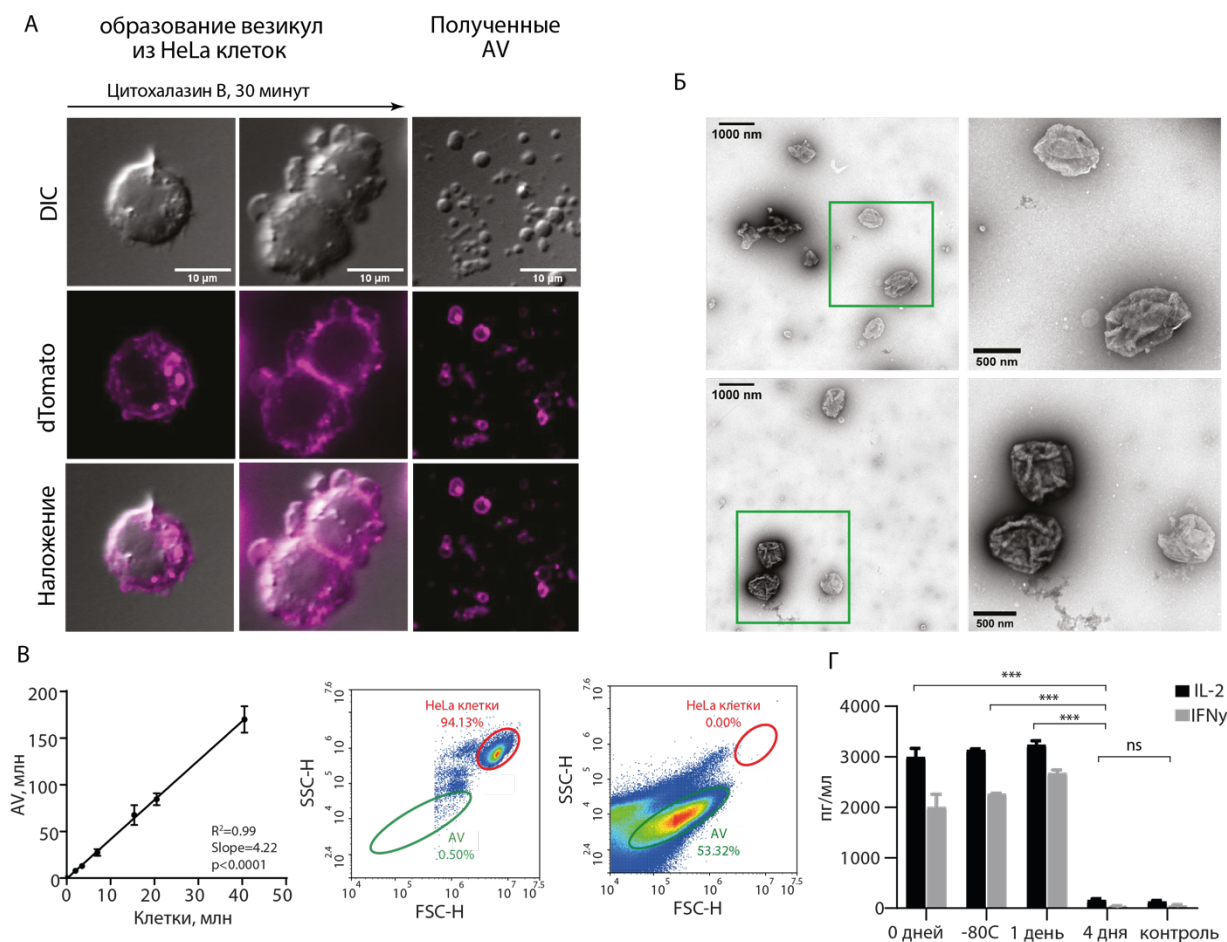


Рисунок 4.57 Получение и характеристика флуоресцирующих искусственных везикул AV. А) Конфокальные изображения процесса формирования AV на мембране клеток HeLa-dTomato в ходе обработки цитохалазином В и последующей очистки. Б) ТЭМ-изображения очищенных AV в разных масштабах. В) График соотношения полученных 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 свежее выделенными, либо хранившимися в разных условиях и в течение разного времени AV. Данные представлены как средние значения с указанием стандартного отклонения.

В некоторых случаях, непросто купить и дорого использовать коммерческие антитела или рекомбинантные белки для обнаружения CAR, особенно если конструкция CAR не предполагает специального тэга или эпитопа для доступных моноклональных антител или флуоресцентно меченных рекомбинантных белков-антигенов. Проблема с детектированием CD33-CAR и CD123-CAR служит наглядным примером. AV с заданной специфичностью, несущие на своей поверхности необходимые антигены, могут служить ценным инструментом для выявления CAR Т клеток. В отличие от других методов детекции CAR, AV не зависят от особенностей структуры CAR, так как связываются непосредственно с антигенсвязывающей частью CAR, которая расположена на ее

поверхности. Для выявления возможностей AV в обнаружении модифицированных Т клеток была разработана панель CAR Т клеток, включающая в себя CAR19, IL13-CAR, HER2-CAR, CD33-CAR и CD123-CAR, что позволяет охватить довольно широкий спектр онкологических заболеваний. Схематическое изображение структур этих CAR и различий в их структуре/связывании с соответствующими антигенами представлено на **рисунке 4.58 А**. Окрашивание CAR Т клеток с помощью AV, содержащих флуоресцентную метку, позволило визуализировать связывание везикул с клетками методом проточной цитофлуориметрии (**Рис. 4.58 Б**). Результаты свидетельствуют о том, что AV способны связываться с CAR Т клетками и окрашивать их аналогично моноклональным антителам (mAb) или рекомбинантным белкам.

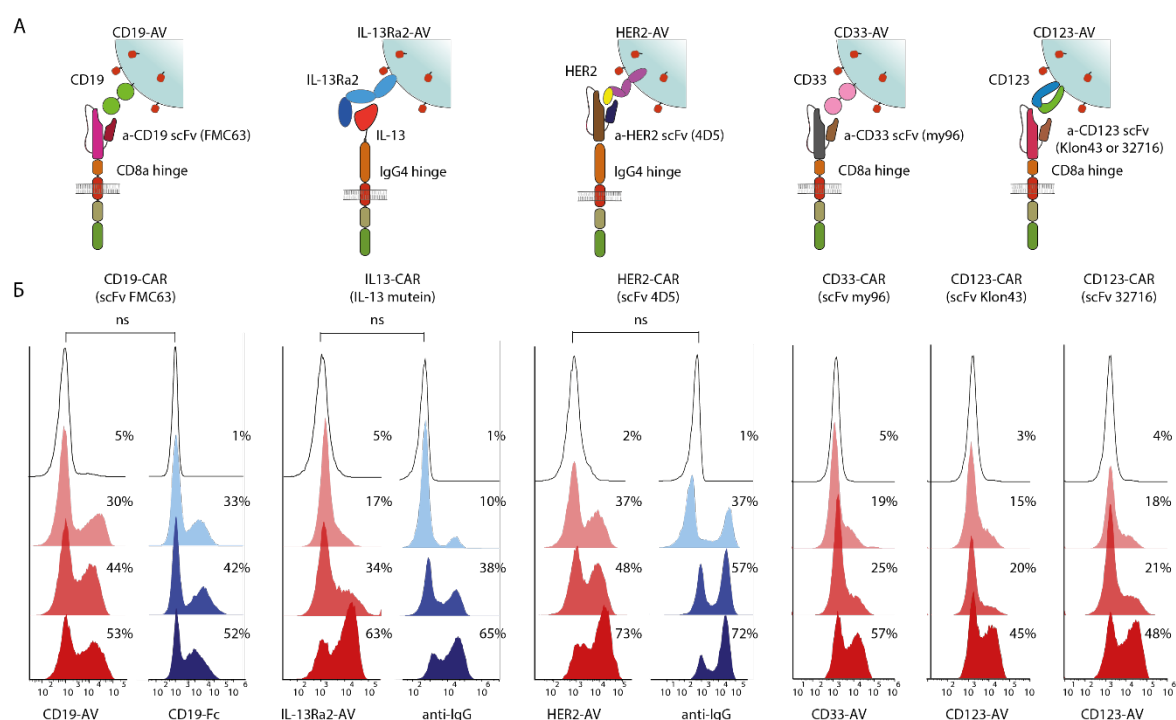


Рисунок 4.58 Антиген-зависимая детекция CAR Т клеток с помощью флуоресцентных AV содержащих опухолевые антигены. А) Схематические изображения взаимодействия CAR с их целевыми антигенами, представленными на поверхности AV с dTomato. Б) Окрашивание CAR Т клеток с помощью AV или специфических антител (реагентов для выявления CAR), представленное в виде гистограмм. Черные гистограммы демонстрируют фоновый сигнал Т клеток, а цифры отображают долю выявленных CAR Т-клеток. Представленные данные являются средним значением двух экспериментальных повторов, выполненных, по крайней мере, в двух независимых экспериментах. Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью непарного t-критерия.

Проточная цитометрия не дает возможности оценить характер взаимодействия везикул с CAR Т клетками. Чтобы понять механизм этого взаимодействия, была использована конфокальная и сканирующая микроскопия CAR19 Т-клеток (а также Т

клеток как отрицательного контроля) после их взаимодействия с CD19-AV (**Рис. 4.59**). 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 (**Рис. 4.59 А**). Таким образом, полученные данные подтверждают специфическое связывание химерного антигенного рецептора на поверхности Т клетки и антигена на искусственных везикулах.

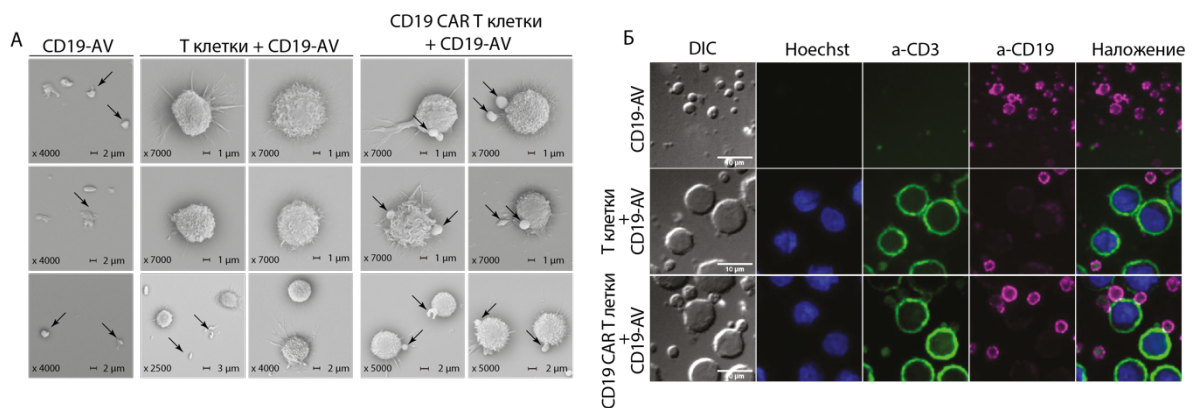


Рисунок 4.59 Сканирующая электронная и конфокальная микроскопия взаимодействия CAR Т клеток с AV. А) СЭМ контрольных и CAR19 Т клеток после коинкубации с CD19-AV. Стрелки указывают на AV, прикрепленные к поверхности CAR Т-клеток. Б) Конфокальная микроскопия Т- и CAR19 Т клеток после инкубации с CD19-AV. 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. 4.60 А**). Для более детального изучения индукции эффекторной функции CAR Т с помощью AV, в частности, продукции провоспалительных цитокинов ИНФγ и ИЛ-2, IL13CAR или CAR19 Т клеток инкубировали с IL13Ra2-AV и CD19-AV, а также с контрольными везикулами, не содержащими антигена (**Рис. 4.60 Б**), в различных соотношениях. Секреция провоспалительных цитокинов, индуцируемая распознаванием антигена, тесно связана с выбросом перфорина и гранзимов CAR Т клетками. Проточная цитофлуориметрия показала дегрануляцию CAR Т клеток, культивируемых с IL13Ra2-AV или контрольными AV (**Рис. 4.60 В**).

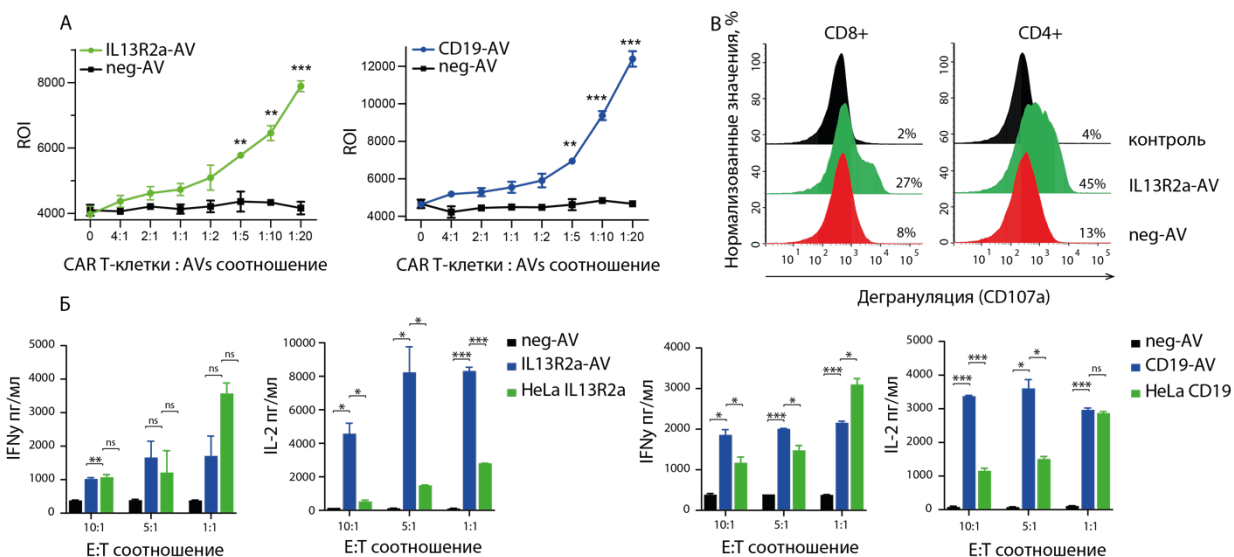


Рисунок 4.60 Искусственные везикулы антиген-зависимо активируют CAR T клетки. А) Анализ активации Jurkat-NFAT-luc CAR T клеток при добавлении AV или контрольных антиген-отрицательными везикулами при различных соотношениях. Б) Анализ секреции ИФН γ и ИЛ-2 IL13-CAR или CAR19 T клетками, культивированными 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. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение из трех экспериментальных повторности. Статистический анализ проводился с использованием дисперсионного анализа ANOVA.

Для анализа влияния CD19-AV на цитотоксичность CAR19 T клеток использовали несколько подходов. В эксперименте использовали продукт CAR19 T клеток 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 (Рис. 4.61 А, В). Данные динамики цитотоксичности (Incucyte анализ) подтверждают, что предварительная кратковременная инкубация с AV усиливает эффекторную функцию CAR T клеток (Рис. 4.61 Б, Г).

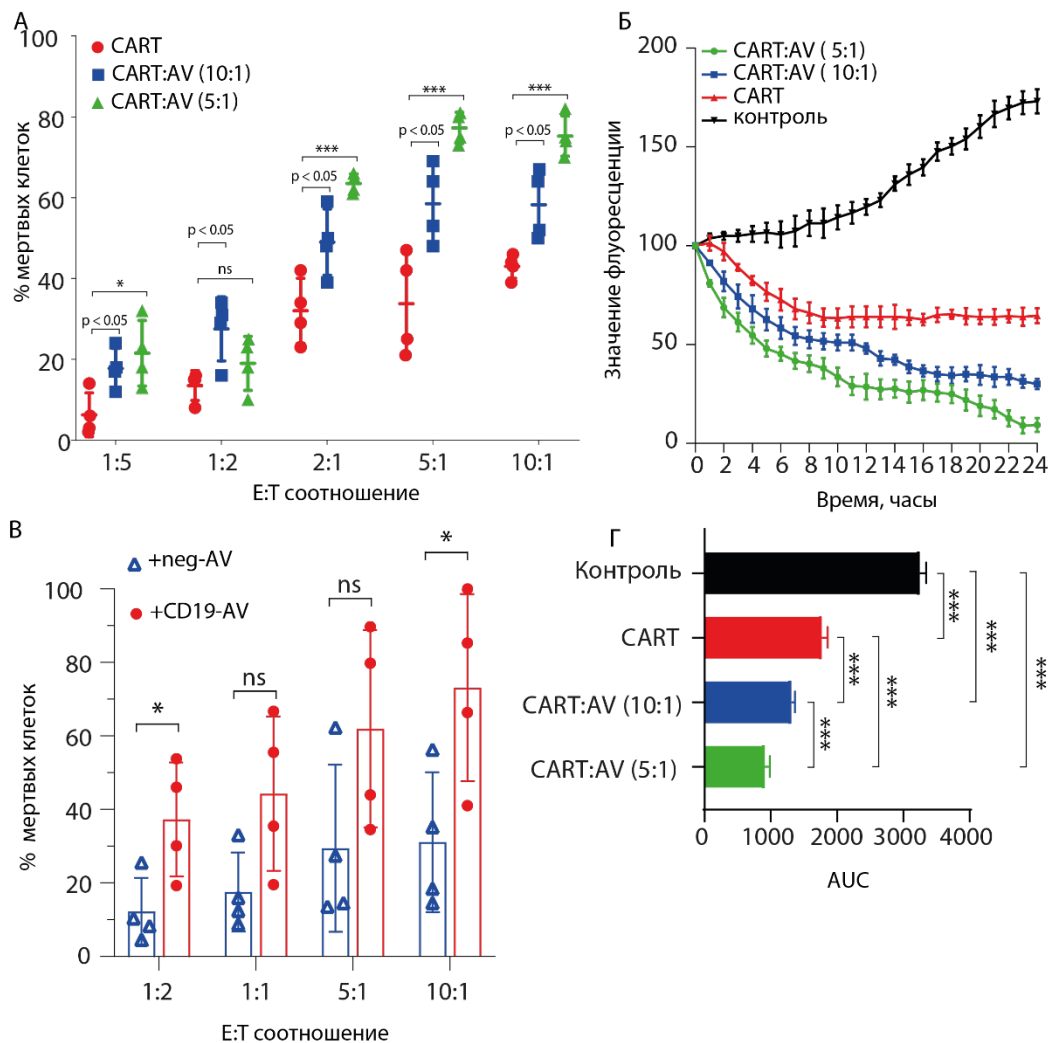


Рисунок 4.61 Искусственные везикулы усиливают цитотоксические свойства CAR T клеток. А) Анализ цитотоксичности CAR19 T клеток, культивированных с CD19-AV при соотношении CAR T: AV 10: 1 или 5: 1 в отношении клеток Jeko-1. Б) Динамический анализ цитотоксичности CAR T клеток после обработки CD19-AV. В) Анализ цитотоксичности CAR19 T клеток, полученных из клеток больных ОЛЛ, которые были культивированы с CD19-AV при соотношении CAR T:AV 5:1. Г) Репрезентативное представление данных Incusyte по рассчитанной площади под кривой (AUC). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение из четырех экспериментальных повторов и представляют не менее двух независимых экспериментов. Статистический анализ проводили, используя дисперсионный анализ ANOVA.

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. 4.62**). Таким образом, AV обладают способностью не только активировать CAR T клетки, но и обеспечивать их длительную пролиферацию и сохранение цитотоксичности, превосходя в

этом стандартные методы стимуляции с помощью рекомбинантных цитокинов или фидерных клеток.

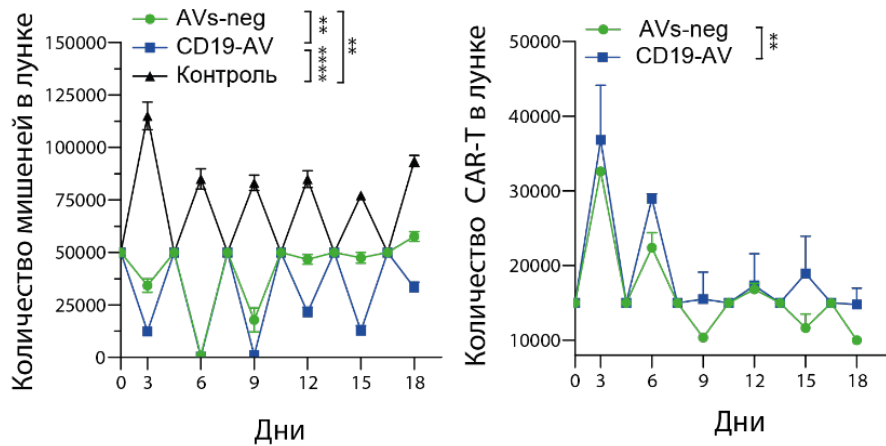


Рисунок 4.62 Результаты теста sequential killing клеток-мишеней CAR19 Т клетками, обработанных CD19-AV или контрольными везикулами. Для оценки количества клеток-мишеней и CAR Т клеток проводили иммуноокрашивание и проточную цитометрию каждые три дня. Затем оставшиеся CAR Т клетки в исходном соотношении смешивали с новыми клетками-мишенями и оставляли для дальнейшей инкубации в течение трех дней. Данный цикл повторяли несколько раз в течение 18- дней. Графики показывают количество выживших клеток-мишеней и эффекторных клеток. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение из трех экспериментальных повторов и представляют не менее двух независимых экспериментов. Статистический анализ проводили, используя t-критерий Стьюдента.

Следующей задачей было выяснение, можно ли применять AV для экспансии CAR Т клеток. CD19-положительные (CD19-AV) и контрольные, не содержащие антиген CD19, AV или neg-AV везикулы были добавлены к CAR19 Т клеткам, предварительно меченным флуоресцентным красителем CFSE. Анализ разбавления сигнала CFSE (число делений клеток) показал, что в контрольной группе neg-AV, не наблюдалось увеличения популяции CAR Т клеток. В то же время, скорость размножения и рост числа CAR19 клеток при инкубации с CD19-AV был сопоставим с тем, что наблюдается при стимуляции ИЛ-2 (**Рис. 4.63 А**). В аналогичном эксперименте с использованием IL13-CAR и везикул, содержащих IL13R2a (IL13R2a-AV), цитофлуориметрический анализ на 1, 4, 5, 6 и 7 день после добавления AV показал постепенное увеличение CAR-положительной популяции (**Рис. 4.63 Б**). В образцах, обработанных контрольными везикулами, доля CAR-положительных клеток оставалась практически неизменной. В то же время, в образцах, обработанных IL13R2a-AV, количество CAR Т-клеток значительно увеличилось с 22% на 1 день до 55% на 7 день. Результаты исследования однозначно свидетельствуют о высокой эффективности антиген-экспрессирующих AV для специфической активации и размножения CAR Т клеток в сочетании с немодифицированными CAR Т лимфоцитами.

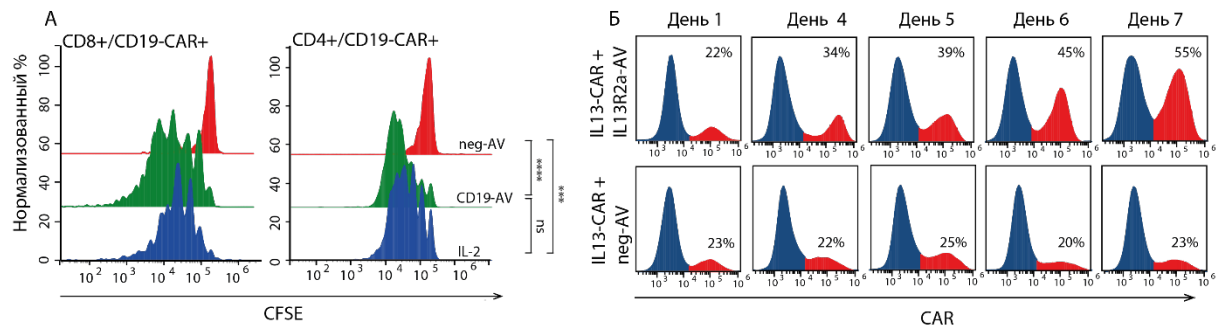


Рисунок 4.63 Экспансия CAR T клеток в присутствии AV. А) Анализ CAR19 T клеток, меченных CFSE. Клетки культивировали в присутствии ИЛ-2, CD19-AV или контрольных AV в соотношении 5:1 в течение 4 дней. Уменьшение сигнала CFSE оценивали с помощью проточной цитометрии. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение из трех экспериментальных повторов и представляют не менее двух независимых экспериментов. Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Б) Увеличение процентного содержания IL13-CAR T клеток, которые культивировали в присутствии 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 Tnaive и Tcm. В противоположность этому, стимуляция Dynabeads/ИЛ-2 или фидерными клетками создавала условия для преобладания клеток Tem и Temra (Рис. 4.63).

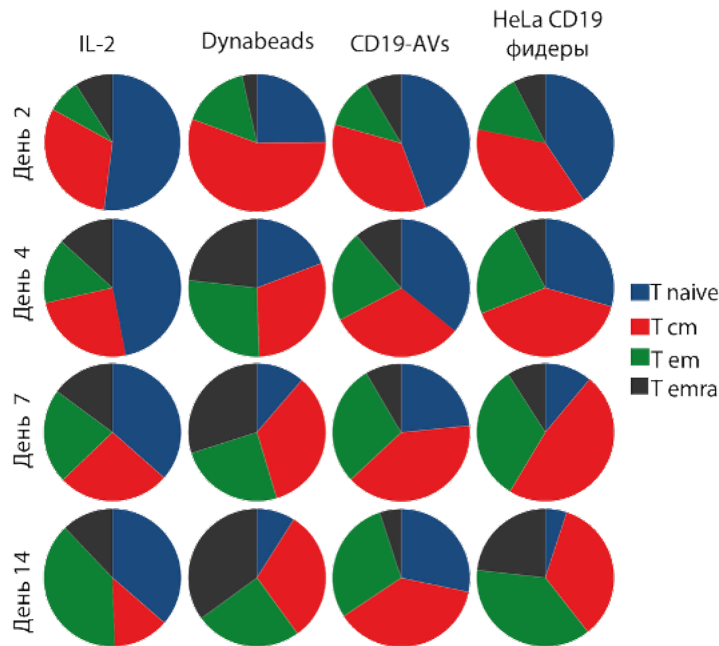


Рисунок 4.63 Изменения фенотипа CAR T клеток в ответ на различные стимулирующие агенты CD3/CD28 Dynabeads/ИЛ-2, ИЛ-2, CD19-AV или фидерные клетки HeLa CD19.

На 7-м и 14-м днях наблюдения скорость размножения AV-стимулированных CAR T клеток была примерно в пять раз выше, чем клеток, стимулированных Dynabeads/ИЛ-2 или HeLa CD19 (**Рис. 4.64 А**). Примечательно, что стимуляция Dynabeads/ИЛ-2 и HeLa CD19, в основном, ускоряла пролиферацию CD4⁺ Т клеток (**Рис. 4.64 Б**). Существенный рост CAR-положительной популяции был зафиксирован только при стимуляции CD19-AV, как у CD4⁺, так и у CD8⁺ Т клеток, показав увеличение с 23% до 31% для CD4⁺ и с 13% до 22% для CD8⁺ (**Рис. 4.64 В**). Исследование количества Т клеток, на которых были повышены маркеры истощения PD-1 и TIGIT, показало, что на 14-й день наименьшая доля TIGIT⁺ клеток была в группе CAR Т-клеток, обработанных CD19-AV (**Рис. 4.64 Г**). В противоположность этому, у CAR Т-клеток, активированных ИЛ-2, процент TIGIT⁺ клеток демонстрировал тенденцию к росту. Важно отметить, что частота Т клеток, несущих на своей поверхности PD-1, была существенно выше в образцах, CAR Т клеток, которые взаимодействовали с фидерными клетками HeLa CD19. Добавление ИЛ-2 оказывало более сильное стимулирующее воздействие на активацию CAR Т клеток, по сравнению с CD19-AV и фидерными клетками, как показано по повышению уровня маркера CD57 (**Рис. 4.64 Г**).

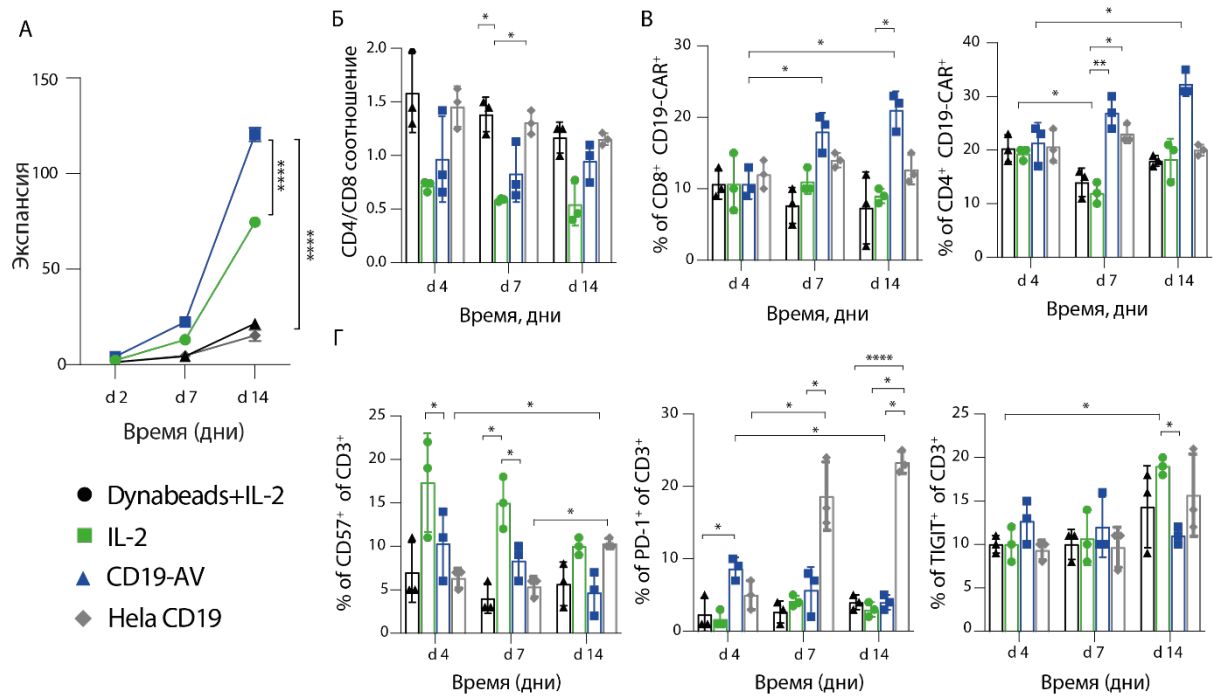


Рисунок 4.64 Фенотипические и популяционные изменения CAR T клеток, вызванные стимуляцией CD19-AV. А) Анализ экспансии CAR T-клеток, подвергшихся воздействию различных стимулов активации. Б) Оценка изменений соотношения CD4/CD8 в популяции клеток CAR19, подвергшихся воздействию различных стимулов активации (фидеров, Dynabeads / ИЛ-2, ИЛ-2 или HeLa CD19). В) Анализ CAR19-положительных клеток в субпопуляциях CD4 и CD8, измеренных с помощью проточной цитометрии на 4, 7 и 14 дни. Г) Анализ фракций клеток CAR19, экспрессирующих маркеры истощения PD-1, CD57 и TIM-1 среди CD3⁺ клеток, подвергшиеся воздействию тех же стимулов, что и в Б. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение из трех экспериментальных повторов и представляют не менее двух независимых экспериментов. Статистический анализ проводили, используя дисперсионный анализ ANOVA.

Для оценки терапевтического потенциала CAR19 T клеток, полученных с использованием CD19-AV, мышам линии NCG внутривенно вводили 1 миллион клеток Nalm-6-ffluc (**рис. 4.65 А**). 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. 4.65 А, 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. 4.65 В). В целом, можно утверждать, что искусственные везикулы AV, несущие антигены, повышают эффективность CAR T клеточной терапии *in vivo*.

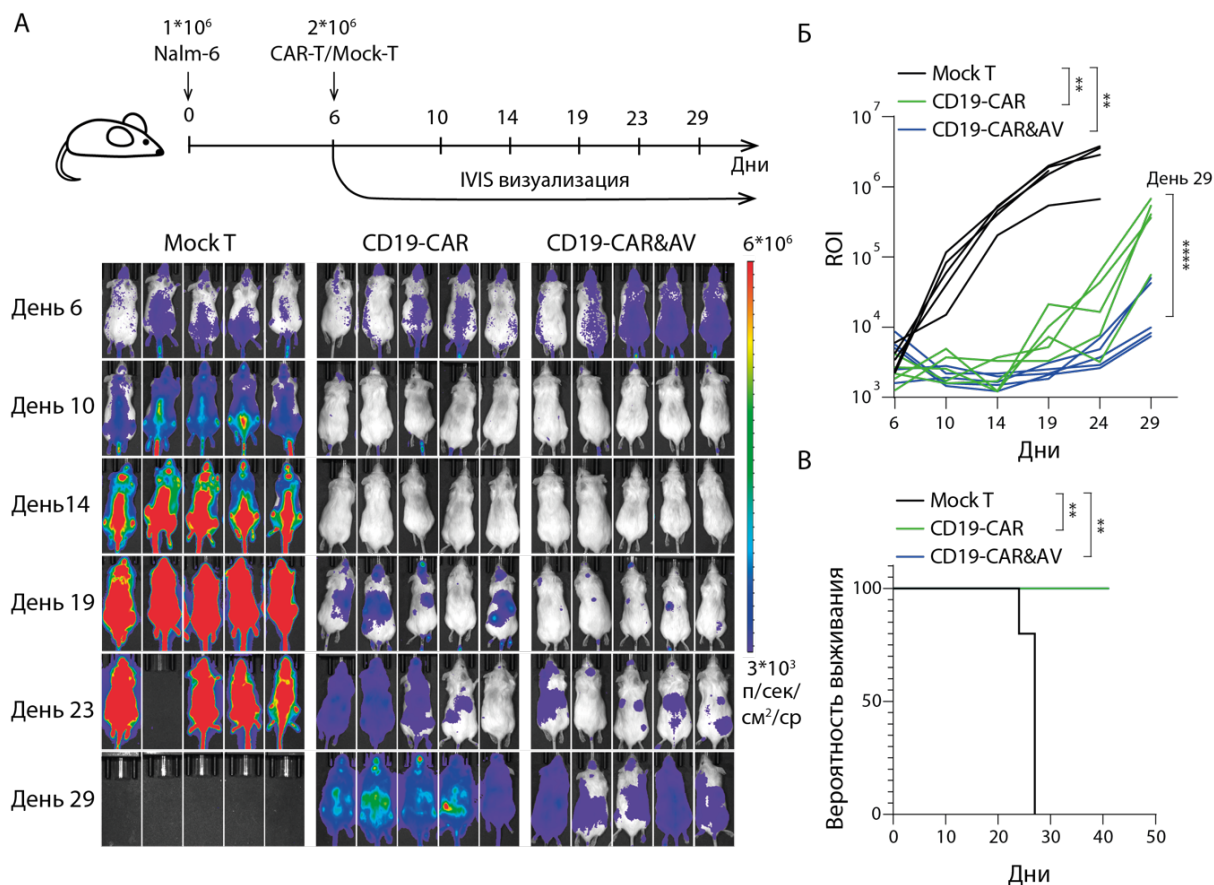


Рисунок 4.65 Анализ эффективности *in vivo* CAR T клеток, предварительно стимулированных CD19-AV или ИЛ-2. А) Мышам с развившейся опухолью на 6 день вводили равное количество контрольных Т клеток (Mock-T) человека или CAR19 Т клеток, которые размножили в присутствии либо ИЛ-2, либо CD19-AV. Б) Опухолевая нагрузка по данным биолуминесцентной визуализации, измеренная с течением времени; Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента. В - Кривая выживаемости Каплана – Мейера. Статистическая значимость рассчитывали с использованием логарифмического рангового критерия Мантеля – Кокса. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение (n=5).

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. Этот эффект обусловлен специфичностью AV к антигену, что исключает активацию нетрансдуцированных Т клеток и позволяет получить CAR Т клеточный продукт с улучшенными показателями для терапевтического применения. По результатам выполненной работы опубликована статья в журнале *Small* [399], а также успешно защищена кандидатская диссертация Украинской Валерии Михайловны, в которой автор диссертации выступал в качестве научного руководителя [395].

4.4.4 ДНКазы I уменьшают негативные эффекты опухолевого микроокружения

Известно, что в опухолевых тканях образуются NET (сети из деконденсированной ДНК и белков клетки), которые создают барьер для проникновения иммунных клеток в опухоль и способствуют образованию метастаз. Помимо этого, образование NET может способствовать развитию устойчивости опухоли к химиотерапии и негативно влиять на функционирование различных органов. Исследования также показали, что NET образуют оболочку вокруг опухолевых клеток, защищая их от разрушения CD8+ Т лимфоцитами и натуральными киллерами, блокируя контакт между иммунными клетками и опухолевыми. Следовательно, разрушение NET в опухолевом очаге может создать возможность для проникновения иммунных клеток-эффекторов. В данном разделе будет описано создание вектора на основе аденоассоциированного вируса для экспрессии ДНКазы I в тканях печени. Полученные результаты свидетельствуют, что однократная инъекция этого вируса способна подавлять рост метастазов в печени и активировать противоопухолевый иммунный ответ.

Дезоксирибонуклеаза I (ДНКазы I), являясь эндонуклеазой, специфически разрушает фосфодиэфирные связи в молекуле ДНК. В ряде опухолевых моделей уже были выявлены определенные антиметастатические свойства ДНКазы I [400]. Несмотря на свой потенциал, применение ДНКазы I в качестве лекарства ограничено рядом факторов. К ним относят короткий период полувыведения, возможная необходимость длительного, пожизненного курса лечения и наличие сильных ингибиторов ДНКазы I в крови пациентов с раком. Например, актин, ключевой компонент системы микрофиламентов эукариотических клеток, связывается с ДНКазой I с очень высокой аффинностью (наномолярным сродством), фактически полностью блокируя ее ферментативную активность [401]. Чтобы получить ДНКазу I, устойчивую к ингибированию актином, был разработан мутантный вариант ДНКазы I с аминокислотными заменами Q9R/E13R/N74K/A114F. В результате

этой модификации удалось добиться повышения ферментативной активности и резистентности к ингибированию актином [401]. Для преодоления ограничений, связанных с коротким временем жизни ДНКазы I, был использован вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV). Вирусный вектор, оснащён специфическим промотором и гепатотропным AAV с капсидом Anc80L65, который позволяет доставлять ген ДНКазы I в клетки печени [402]. Данный подход к доставке гена ДНКазы I может стать перспективным средством для замены ежедневных инъекций препарата очищенного фермента, обеспечивая длительный терапевтический эффект.

Чтобы оценить эффективность AAV-ДНКазы I, были использованы аденоассоциированные вирусы Anc80L65 для эктопической секреции этого фермента клетками раковой ткани печени (Рис. 4.66 А). Клетки HepG2 трансдуцировали вирусными частицами AAV-ДНКазы I или контрольными AAV-null. Секреция ДНКазы определял, анализируя активность ДНКазы в клеточном супернатанте. На рисунке 4.66 Б видно, что в течение 72 часов после проведения трансдукции происходит значительный рост активности ДНКазы I в культуральной среде. Результаты демонстрируют, что AAV-опосредованная доставка гена ДНКазы I в гепатоциты *in vitro* вызывает стабильную дозозависимую секрецию ДНКазы I, при этом не наблюдается значимого токсического эффекта.



Рисунок 4.66. Создание аденоассоциированных вирусов, несущих ДНКазу, и оценка активности, полученной ДНКазы *in vitro*. А) Схематическое изображение конструкции AAV-ДНКазы I. Б) Анализ *in vitro* активности ДНКазы на клеточной линии HEPG2 при добавлении различного количества AAV-ДНКазы I, либо AAV-null к клеткам. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Чтобы оценить терапевтический потенциал AAV-ДНКазы I в ингибировании метастазирования колоректального рака (CRC) в печень, мышам через воротную вену вводили клетки линий рака толстой кишки MC38. Через четыре дня после трансплантации клеток MC38 мышам вводили вектор AAV-ДНКазы I ($1,05 \times 10^{12}$ копий генов) или AAV-null, и отслеживали динамику роста опухоли в течение 21 дней (Рис. 4.67 А).

Визуализация опухоли с использованием биолуминесценции выявила, что у мышей, которым была введена AAV-ДНКазы I, наблюдалось снижение развития метастазов по сравнению с контрольной группой, получившей AAV-null ($P < 0,05$) (Рис. 4.67 Б, В). Данное

снижение, как предполагается, связано с ферментативной активностью ДНКазы I, которая разрушает ДНК, входящую в состав NET, тем самым препятствуя образованию плотных метастазов. Исследования также продемонстрировали, что единичное введение AAV-ДНКазы I способствовало замедлению прогрессирования метастазов в печени у обоих полов (самцов и самок), по сравнению с мышами, которым была введена AAV-null (Рис. 4.67 Г). Кроме того, введение AAV-ДНКазы I существенно сократило количество метастатических узлов ($P < 0,05$) (Рис. 4.67 Д, Е). Полученные данные свидетельствуют о том, что введение AAV-ДНКазы I эффективно ингибирует развитие метастазов в печени в модели CRC.

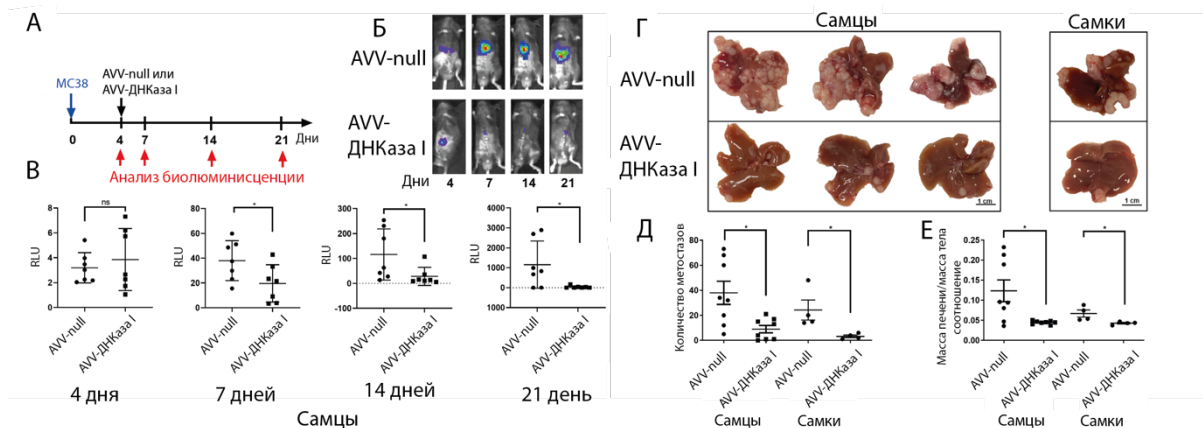


Рисунок 4.67 Эффект AAV-ДНКазы I в мышинной модели колоректального рака (перевиваемая клеточная линия MC38). А) Схема эксперимента. Б) Мышам с развившейся опухолью на 4 день вводили равное количество AAV-ДНКазы I, либо AAV-null. В) Динамика роста опухоли по данным биолуминесцентной визуализации, измеренная с течением времени в двух группах, пролеченных либо AAV-ДНКазы I, либо AAV-null. Г) Изображения, характеризующие количество метастазов на 21 день после введения опухоли в группах мышей, пролеченных либо AAV-ДНКазы I, либо AAV-null. Д) Зависимость количества метастазов от пола мыши, измеренная с течением времени в двух группах пролеченных либо AAV-ДНКазы I, либо AAV-null. Е) Зависимость отношения веса печени к весу тела от пола мыши, измеренная с течением времени в двух группах, пролеченных либо AAV-ДНКазы I, либо AAV-null. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Для оценки присутствия иммунных клеток в опухолевом микроокружении (TME) был проведен иммуногистохимический анализ количества CD4⁺ и CD8⁺ Т клеток в метастатической ткани (Рис. 4.68). Введение AAV-ДНКазы I приводило к значительному увеличению процента CD8⁺ Т клеток в опухоли по сравнению с группой, получившей AAV-null ($P < 0,01$) (Рис. 4.68 Б). В то же время, количество CD4⁺ Т клеток, инфильтрирующих опухоль, оказалось одинаковым во всех группах (Рис. 4.68 Г). Дополнительно, методом проточной цитофлуориметрии, была подтверждена тенденция в изменении процентного соотношения CD4⁺ и CD8⁺ Т клеток в опухоли. У мышей, которым была введена AAV-ДНКазы I, доля CD8⁺ Т клеток оказалась существенно выше, чем у мышей, получивших AAV-null ($P < 0,05$) (Рис. 4.68 Б, Г). Несмотря на незначительное

повышение количества CD4⁺ Т клеток у мышей, получавших AAV-ДНКазы I, наблюдалось снижение количества опухоль-ассоциированных нейтрофилов в ТМЕ (Рис. 4.68 В).

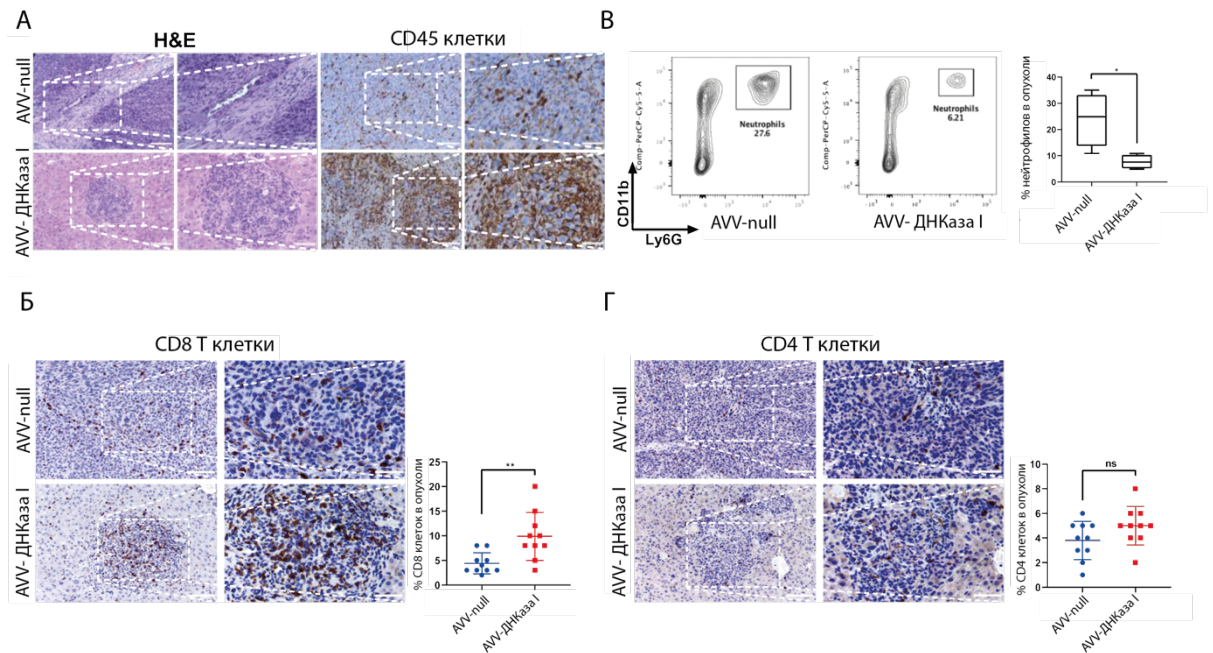


Рисунок 4.68 Анализ иммунных клеток в опухолях мышей после введения AAV-ДНКазы I и AAV-контроль. А) Иммуногистохимия опухолей животных из экспериментальных групп, окрашенных на CD45 Б) Иммуногистохимия опухолей, окрашенных на CD8 В) Цитофлуориметрический анализ нейтрофилов в опухолевом микроокружении. Г) Иммуногистохимия опухолей, окрашенных на CD4.

Таким образом, AAV-опосредованный перенос гена ДНКазы I является эффективным методом борьбы с NET, способный сбалансировать взаимодействие врожденного и адаптивного иммунитета в опухолевой среде, что в итоге восстанавливает иммунный контроль над раковыми клетками. Чтобы оценить возможный синергетический эффект AAV-ДНКазы I и CAR Т клеток были проведены эксперименты на сингенной модели меланомы с метастазами в легкие. Клетки меланомы мыши B16 экспрессирующие люциферазу светлячка и рецептор эпидермального фактора роста человека (EGFR) были любезно предоставлены проф. Пенгом Бу (Scripps Research, США). Для создания CAR были использованы последовательности переменных доменов анти-EGFR антитела (Цетуксимаб) в составе CAR содержащего трансмембранный и внутриклеточный домены CD28 мыши и CD3z мыши. Для производства CAR Т клеток были использованы спленоциты мышей линии C57BL/6 из которых выделили Т клетки для последующей активации и ретровирусной трансдукции. Для формирования метастаз в легкие мышам линии C57BL/6 через хвостовую вену внутривенно вводили 0,8 млн. клеток B16-hEGFR/ffluc. На следующий день животные получали внутривенные инъекции контрольных AAV или AAV-ДНКазы I в количестве 10^{12} копий гена на мыш. Через семь дней, для предтрансплантационной подготовки перед адоптивным переносом Т клеток,

мышам внутрибрюшинно вводили 100 мг/кг циклофосфида. На следующий день животным вводили 2×10^6 анти-EGFR CAR T клеток (**Рис. 4.69 А**). В качестве контроля были использованы CAR специфичные к раково-эмбриональному антигену. Результаты прижизненной визуализации опухоли показали, что у мышей, которым вводили CAR T клетки в комбинации с ААВ-ДНКазы I опухоли развиваются существенно медленнее или не развиваются вовсе (**Рис. 4.69 А, Б**). Также, ААВ-ДНКазы I приводила к большей выживаемости животных при совместном введении с CAR T клетками (**Рис. 4.69 В**).

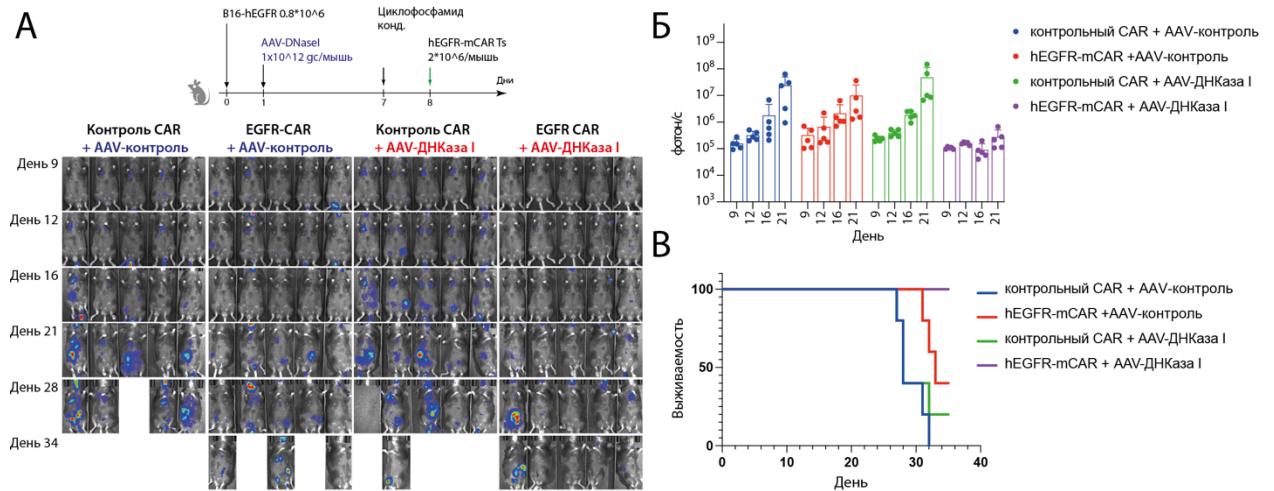


Рисунок 4.69 Синергетический эффект ААВ-ДНКазы I и CAR T клеток на сингенной модели меланомы. А) Схема эксперимента (верх). Прижизненная визуализация опухолевых клеток меланомы B16-hEGFR/ffluc. Мышам линии C57BL/6 вводили 0,8 млн. клеток B16-hEGFR/ffluc. На следующий день мышам вводили контрольные ААВ или ААВ-ДНКазы I в количестве 10^{12} копий гена на мышь. На 8 день животным вводили 2×10^6 контрольных или анти-EGFR CAR T клеток. Б) Опухолевая нагрузка по данным биолуминесцентной визуализации, измеренная с течением времени из А). В) Кривые выживаемости Каплана–Мейера животных из всех экспериментальных групп.

Полученные данные указывают на то, что ААВ-опосредованная доставка гена ДНКазы I усиливает противоопухолевый иммунный ответ, воздействуя на как врожденные, так и адаптивные механизмы иммунной системы. По результатам выполненной работы были опубликованы статьи в *Molecular Oncology* [318] и *Acta Naturae* [308].

5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Высокий уровень интереса и активное обсуждение роли CAR T клеток в терапии будущего во многом обеспечено удачным выбором антигена и заболевания при проведении первых клинических испытаний. CD19 является практически идеальной мишенью для CAR T клеток. Данный антиген представлен на поверхности основной массы В-лимфоцитов, включая большинство В-клеточных опухолей, таких как острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), а также ряде лимфом, и практически не встречается на других типах клеток. Безусловно, CAR T клеточная терапия стала одним из наиболее ярких достижений современной онкологии и иммунологии, позволившая излечивать пациентов, которые ранее считались безнадежными [403]. Сыграли свою роль и особенности научного сообщества США, активно продвигающего свои достижения в практическую медицину. В результате CAR T клетки стали символом прогресса в области иммунотерапии, вызвав волну ожиданий и инвестиций в дальнейшие исследования и коммерциализацию. Необходимо отметить, что существенный прогресс в области CAR T клеточных технологий тесно связан с успешным развитием методов молекулярной и клеточной биологии, геномного редактирования, методов комбинаторной химии и биологии, а также омиксных технологий.

Однако, попытки расширить область применения модифицированных лимфоцитов быстро выявили ряд существенных проблем [404]. Для успешного использования CAR T клеточной терапии при различных типах рака необходимо решить вопросы безопасности, обеспечить высокую специфичность и правильный выбор антигена, снизить стоимость лечения, оптимизировать процессы получения клеточного продукта и определить исходную популяцию клеток. Кроме того, основной проблемой низкой эффективности CAR T клеток при терапии солидных опухолей является не только выбор опухолев-специфического антигена, но и иммуносупрессивное микроокружение опухоли [405]. Большинство перечисленных проблем являются актуальными и сегодня. С другой стороны, последнее десятилетие было в значительной мере посвящено решению этих вызовов, что привело к появлению множества перспективных разработок. Некоторые из них находятся на различных стадиях клинических испытаний или применяются в рамках академических исследований, открывая новые возможности для расширения нозологий применения и повышения эффективности CAR T клеточной терапии.

Важно отметить, что терапия CAR19 T клетками не ограничивается введением модифицированных лимфоцитов пациенту. Уничтожение CD19-положительных клеток приводит к элиминации не только опухолевых клеток, но и здоровых лимфоцитов. У

большинства пациентов наблюдается значительное снижение или полное отсутствие В-лимфоцитов в периферической крови. Согласно данным клинических исследований примерно у 70-80% пациентов В-лимфопения сохраняется в течение как минимум 6 месяцев после терапии или дольше [65, 406, 407]. В результате у пациентов развивается гипогаммаглобулинемия — снижение уровня иммуноглобулинов, что увеличивает риск инфекционных осложнений. Для профилактики инфекций часто назначают курс внутривенного иммуноглобулина (IVIG), который помогает компенсировать дефицит антител [406]. Поэтому крайне важно соблюдать строгие условия содержания пациента и проводить адекватную поддерживающую терапию. Все это приводит к дополнительному увеличению стоимости изначально дорогой CAR T клеточной терапии и увеличивает риски для пациентов. При высокой стоимости одного введения CAR19 T клеток почти пол миллиона долларов США [333], значительная часть цены обусловлена коммерческими интересами компаний, для компенсации значительных расходов, связанных с разработкой, клиническими испытаниями, лицензированием и патентной защитой.

Еще одной важной проблемой терапии CAR19 T клетками является рецидив опухоли, вероятность которого в ближайшие два года составляет 30-60% [65, 408]. Особенно высок риск рецидива у пациентов с тяжелой В-лимфопенией или недостаточной экспрессией CD19 на опухолевых клетках. Значительная часть случаев связана с появлением CD19-негативных опухолевых клеток, что составляет примерно 10-30% всех рецидивов [406].

Отличительной особенностью многих лимфом и лейкозов является наличие уникальных и опухолеспецифичных антигенов – В- и Т-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. В нашей работе мы предложили рассмотреть BCR и TCR опухолевых клеток 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.

Для поиска лигандов В-клеточных рецепторов опухолевых клонов мы решили использовать систему репортерных клеток и лентивирусную библиотеку циклопептидов в составе химерного рецептора. Аутокринная селекция включает несколько ключевых этапов: поиск В-клеточного рецептора опухолевых клеток; создание репортерных клеток, экспрессирующих данный рецептор; трансдукция этих клеток лентивирусной библиотекой, кодирующей трансмембранно-заякоренные лиганды; отбор активированных клеток, содержащих ген провзаимодействовавшего лиганда; формирование суббиблиотеки после первого раунда отбора; и повторение процесса отбора для повышения специфичности и

эффективности. В нашей работе мы показали, что аутокринный метод селекции позволяет отбирать направляющие циклопептиды для персонализированной CAR T 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.

Далее, нами была показана возможность направленной элиминации опухолевых Т-клеток CAR Т-клетками при терапии Т-клеточной лимфомы и лейкемии. В отличие от В-клеточных заболеваний, существенной проблемой создания CAR Т-клеток для элиминации патологических Т-клеток является выбор антигена и перекрестная цитотоксичность. Так же, как и для разработанного нами подхода терапии В-клеточных лимфом за основу был взят поиск уникальной последовательности поверхностного иммуноглобулина Т-клеток, отличающей опухолевый клон от здоровых лимфоцитов. Нами был выбран участок CDR3 Т-клеточного рецептора (TCR), который был получен в виде биотинилированного пептида и использован для проведения фагового дисплея библиотеки одноцепочечных антител человека. Отобранные антитела были включены в состав CAR в качестве антиген-распознающих доменов. В экспериментах *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* мы показали высокую специфичность CAR Т-клеток, которые элиминировали только опухолевые Т-клетки. Одним из наиболее показательных примеров эффективности и безопасности предлагаемого подхода было проведение анализа репертуара Т-клеточных рецепторов биоптата пациента после ко-инкубации клеток пациента с CAR Т-клетками специфичными к TCR опухолевых клеток. Секвенирование CDR3 регионов TCR показало, что при добавлении персонифицированных CDR3-специфичных CAR Т-клеток в культуру были полностью элиминированы опухолевые клоны, а здоровые Т-клетки остались нетронутыми. 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.

Накопленный опыт получения библиотек иммуноглобулинов, создания репортерных клеток и проведения отборов позволил нам обнаружить антитела, являющиеся специфическими агонистами TrkB. Одно из отобранных антител (клон ZEB85) оказалось настолько же эффективным, как и BDNF в отношении стимуляции культуры нейронов

человека, и на данный момент антитело ZEB85 находится на первой фазе клинических испытаний для терапии диабетической ретинопатии. В свою очередь, технология реконструкции природного репертуара антител человека позволила получить высокоэффективные нейтрализующие антитела человека, предотвращающие заражение вирусом SARS CoV-2 провести детальный анализ репертуара SARS CoV-2-нейтрализующих антител человека после вакцинации.

Несмотря на все преимущества CAR T клеток специфичных к В- и Т- клеточным рецепторам, на сегодняшний день, активное внедрение персонифицированных CAR затруднено высокими требованиями к безопасности клеточного продукта. Для каждого нового CAR требуется проведение клинических испытаний и подтверждения профиля безопасности. Поэтому в ближайшем будущем продолжают широко использоваться CAR T клетки, нацеленные на антигены, общие для определённых групп опухолевых заболеваний.

Одним из проверенных способов терапии В-клеточного острого лимфобластного лейкоза является аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Однако, рецидив после алло-ТГСК остается основной причиной смертности у пациентов с острым В-клеточным острым лимфобластным лейкозом. Традиционные методы лечения, такие как химиотерапия, инфузия донорских лимфоцитов и повторная трансплантация при рецидиве после алло-ТГСК также недостаточно эффективны. Важно отметить, что данная терапия недоступна для части пациентов с наследственными заболеваниями, так как для них предтрансплантационная химио- или радиотерапия крайне опасны. В данном случае применение CAR T клеток оказалось очень эффективным. Применение CAR19 Т клеток у пациентов с рецидивом после алло-ТГСК, приводило к полной ремиссии у большинства пациентов. Полученные результаты привели к новому формату применения CAR T клеток – сочетанной терапии или “bridging therapy” при которой пациенту вводятся CAR Т клетки до или после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Также, в доклинических исследованиях уже показана высокая эффективность миелоабляции гемопоэтических стволовых клеток и предшественников с помощью CAR Т клеток, специфичных к таким антигенам, как CD117, CD33 и CD123. Все эти антигены были в некоторой степени компромиссным решением, так как ограничивали область применения адоптивной иммунотерапии мишенями отсутствующими на поверхности самих CAR Т клеток. В нашей работе мы предложили направить цитотоксичность CAR Т клеток к антигену CD45, представленному на большинстве гемопоэтических клеток (за исключением тромбоцитов и эритроцитов), включая Т клетки, и отсутствующий на клетках остальных тканей. Такие свойства делают CD45 уникальной мишенью для кондиционирования пациентов перед алло-ТГСК. Основным препятствием к созданию

CAR T клеток специфичных к CD45 является кросс-цитотоксичность CAR T клеток по отношению к CD45 на поверхности самих T клеток. Появление технологий редактирования генома сделало возможным нокаут генов поверхностных рецепторов T клеток и стало отдельно развивающимся направлением в иммунотерапии (CD5-CAR, CD7-CAR и др.). Параллельно с нами подход создания CD45-специфичных CAR T клеток устойчивых к аутоксичности, но с изменением отдельных нуклеотиды в ДНК без разрезания двойной спирали, был реализован в Университете Пенсильвании в лаборатории под руководством Карла Джуна (пионера и ключевой фигуры в области создания CAR T клеток) [365]. В своей работе авторы утверждают, что нокаут гена *PTPRC* лишает CAR T клетки функциональности, однако в нашем случае CD45^A CAR45 T клетки элиминировали опухолевые и гемопоэтические клетки *in vitro* и *in vivo*. По всей видимости это связано с различными костимуляторными сигнальными доменами в CAR, группа под руководством К. Джуна использовала 4-1BB, а в нашей конструкции присутствует сигнальный домен OX-40. Различия в сигналинге у CAR с разными костимуляторными доменами в отсутствие CD45 легли в основу нашей работы, которая готовится к публикации. Применение CAR T клеток широкой специфичности предъявляет повышенные требования к безопасности иммунотерапии. Необходимо учитывать последствия длительной персистенции CAR45 T клеток, которые могут осложнить трансплантацию донорских клеток. Одним из решений может выступить дополнительное кондиционирование пониженной интенсивности после введения CAR45 T клеток. Набирающим популярность способом контролировать персистенцию CAR T клеток является введение генов суицидальных молекул, которые были подробно описаны в обзоре литературы, или доставке генов CAR в виде мРНК, ограничивая время трансляции рецептора.

Как уже упоминалось ранее, комбинация аутологичных CAR19 T клеток с алло-ТГСК оказалось довольно эффективной для пациентов с рецидивирующим ОЛЛ. Однако, несмотря на высокий процент полной ремиссии, у части пациентов НМИЦ детской гематологии и онкологии имени Дмитрия Рогачева, даже после такой интенсивной терапии наблюдались повторные рецидивы. Вероятно, повторные рецидивы были связаны с исходной популяцией лимфоцитов, использованных при изготовлении CAR T клеток. Часто после проведения нескольких раундов химио- или радиотерапии, а также в результате применения препаратов антител крайне сложно получить функциональные T клетки пациента. В таких случаях единственной альтернативой выступает использование аллогенных CAR, приготовленных из клеток здорового донора. Однако, алло-CAR T терапия сопряжена с высоким риском развития реакции трансплантата против хозяина. Поэтому, для снижения рисков развития РТПХ, было принято решение изготовить CAR T

продукт из клеток памяти от гаплоидентичных доноров. Для производства CAR19 Tm клеток была использована система CliniMACS, которая обеспечивает закрытый цикл производства CAR T клеток. В работе описан первый мировой опыт клинического применения данной системы. Децентрализованное производство CAR T клеток на базе клинических центров наиболее востребовано именно для таких, особенных случаев, требующих креативного подхода к созданию индивидуального лекарства с учетом состояния и истории болезни каждого пациента в отдельности. Мы показали, что в клеточном продукте большую часть CAR19 Tm клеток составляют CD4+ T лимфоциты с повышенным уровнем экспрессии маркеров истощения LAG3 и TIGIT по сравнению с CAR19 T клетками, полученными ранее. Однако, несмотря на то что фенотипически CAR19 Tm клетки отличались от CAR19 T клеток, введение CAR19 Tm клеток оказалось эффективным для четырех из пяти пациентов. Важно отметить, что в ходе наблюдения за пациентами не было выявлено случаев тяжелых РТПХ и нейротоксичности. Неожиданно цитофлуориметрический анализ крови пациентов после введения показал, что только у одного из пациентов CAR19 Tm клетки находятся в детектируемом количестве. Таким образом, CAR19 Tm клетки оказались высокоэффективными, но при этом их поведение существенно отличается от CAR19 T клеток. Интересно, что анализ цитотоксичности CAR T клеток показал, что CAR19 Tm и CAR19 T клетки с одинаковой эффективностью лизируют опухолевые клетки, но при этом раньше теряют цитотоксичность при продолжительной стимуляции. Анализ транскриптома показал отличия в экспрессии маркеров дифференцировки Т-лимфоцитов, таких как LEF1, TCF7, CD86, CD38 и IRF8 между CAR19 Tm и CAR19 T клетками. CAR19 Tm клетки характеризуются набором маркеров, свойственных более дифференцированным клеткам, при этом уровень мРНК транскрипционного фактора TCF7 у них минимален. Исследования показали, что TCF7 — ключевой фактор, определяющий функциональную активность и терапевтический потенциал CAR T клеток. Это связано с тем, что CAR19 Tm лимфоциты в основном представлены популяциями памяти, преимущественно T_E лимфоцитами. Также CAR19 Tm клетки демонстрируют повышенную экспрессию мРНК интерлейкинов семейства ИЛ-2 (ИЛ-4, ИЛ-15, ИЛ-21) и маркеров истощения Т клеток (CTLA-4, TIGIT, KLRB1). В результате нашей работы впервые было описано и охарактеризовано успешное клиническое применение CAR19 Tm клеток у пациентов с В-ОЛЛ без возникновения РТПХ и других серьезных побочных реакций.

Независимо от выбора антигена, введение пациенту CAR T клеток с существенным потенциалом к делению и активации сопряжено с рисками связанными с избыточной активностью Т клеток. Химерный рецептор распознает антиген и немедленно активирует Т

клетку, и это происходит в организме пациента с миллионами CAR T клеток. После введения их количество увеличивается примерно в тысячу раз [35]. Данные процессы сложно контролировать или быстро остановить, что может привести к развитию синдрома выброса цитокинов, гиперактивации иммунной системы, истощению CAR T клеток, и, как следствие, недостаточной эффективности терапии и рецидиву опухоли. Для повышения безопасности применения CAR T клеток была предложена концепция разделения этапов распознавания антигена и передачи сигнала к активации через CAR с помощью адаптерных молекул. В данных системах адаптерная молекула (чаще всего белок) распознает антиген и, одновременной с этим, другая часть адаптера выступает в роли антигена для CAR. В результате CAR может распознавать опухолевые клетки и передавать сигналы активации только при наличии медиатора между CAR T клеткой и опухолевыми клетками. Также, разделение этапов распознавания и уничтожения опухолевых клеток с помощью адаптерных молекул позволяет настраивать чувствительность CAR T лимфоцитов к количеству опухоль-ассоциированного антигена на поверхности клеток и лучше дифференцировать опухолевые клетки от здоровых тканей, что особенно актуально при терапии солидных опухолей. Уже известны случаи успешного применения адаптерных CAR T клеток в клинических испытаниях (NCT04450069). Важно отметить, что оптимизация дозирования адаптерной молекулы позволило не только контролировать скорость элиминации опухолевых клеток, но и фенотип, скорость экспансии и персистенцию CAR T клеток [409].

На сегодняшний день описано несколько адаптерных CAR на основе белковых молекул, которые основаны на разных белок-белковых взаимодействиях. Мы решили создать адаптерную молекулу, которая не только направляет активность CAR T клеток, но также обладает самостоятельной цитотоксичностью. Для этого, совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН под руководством С.М. Деева, были созданы регулируемые CAR T клетки на основе взаимодействия РНКазы барназа и ее природного ингибитора барстар. В результате оптимизации структуры барстара в составе CAR нам удалось создать Bs-CAR T клетки, которые, в зависимости от концентрации адаптерной молекулы с барназой, лизировали HER2-положительные опухолевые клетки и секретировали провоспалительные цитокины. Важно отметить, что адаптерные белки дарпин 9.29-барназа и дарпин G3-барназа сами по себе оказывали цитотоксическое действие на опухолевые клетки в культуре. Эффективность адаптерных Bs-CAR T клеток была подтверждена *in vivo* на животных моделях. Было показано, что совместное введение BsCAR T клеток и адаптерных молекул дарпин-барназа эффективно подавляет рост опухоли или полностью уничтожает раковые клетки.

Для всех адаптерных CAR характерны возможные ограничения применимости, обусловленные потенциальной иммуногенностью экзогенных белков. Несмотря на данные о низкой иммуногенности барназы и барстара, при дальнейшем развитии модульных систем на основе BsCAR будет необходимо провести дополнительные исследования фармакокинетики и иммуногенности молекул-посредников, а также оценивать возможный иммунный ответ на компоненты системы CAR.

С другой стороны, возможность контролировать активность CAR T клеток с помощью низкомолекулярных соединений была доказана только для молекул, конъюгированных с FITC. Конъюгат фолата с FITC был способен дозозависимо перенаправлять цитотоксическую активность анти-FITC CAR T клеток *in vitro* и *in vivo*, а также купировать синдром высвобождения цитокинов после введения большого количества CAR T клеток. С развитием дисплейных технологий, искусственного интеллекта, и методов компьютерного дизайна появляется все больше органических соединений, которые можно использовать для создания низкомолекулярных адаптеров CAR T клеток. Нами было принято решение создать регулируемые CAR T клетки, активность которых контролируется неиммуногенным гаптенами, а также развить идею применения низкомолекулярных адаптеров. Для создания части CAR, которая взаимодействует с адаптером был выбран гуманизированный вариант каталитического антитела 38C2 катализирующего альдольные и ретро-альдольные реакции. В физиологических условиях реактивный остаток лизина антитела образует обратимую ковалентную связь с 1,3-дикетоном, а также с другими функциональными группами, содержащимися в карбонильных соединениях, таких как β -лактамы. Важно отметить, что, антитело 38C2 уже проходило клинические испытания и доказало свою безопасность (NCT00879684, NCT00982657, NCT01441414, NCT00886821, NCT01301456, NCT01637285, NCT00879554, NCT01004822), а широкая модифицируемость адаптеров с 1,3-дикетонной группой позволяет гибко перенастраивать специфичность терапии без необходимости реконструировать сам CAR. CovCAR T клетки на основе антитела 38C2 обладают рядом преимуществ по сравнению с FITC-специфическими CAR. Благодаря ковалентной связи, образуемой между адаптером и 38C2, обеспечивается более стабильная и длительная активация CAR T клеток в опухоли, особенно при понижении внутриопухолевого pH. Также, стабильная связь CovCAR с адаптером позволяет T клеткам связывать соединения 1,3-дикетона вне опухоли, где доступна высокая концентрация адаптеров, а затем мигрировать в опухолевые ткани. Нами была продемонстрирована эффективность регулируемых CovCAR T клеток против различных типов опухолевых клеток, экспрессирующих рецепторы фолиевой кислоты и простатический специфический

мембранный антиген, как *in vitro*, так и *in vivo*. Важно отметить, нами была показана возможность контролировать эффективность и персистенцию CovCAR T-клеток *in vivo*, с помощью низкомолекулярных соединений. В известной степени этот подход можно охарактеризовать как первый случай применения “каталитических” CAR T клеток. Таким образом, полученные данные подтверждают возможность фармакологической регуляции активности CovCAR T клеток после введения. Однако, существенным ограничением развития всех низкомолекулярных адаптеров CAR T клеток является отсутствие органических лигандов опухоль-ассоциированных антигенов, либо их недостаточная аффинность. Скрининг больших библиотек химических соединений с помощью роботизированных систем требует большого количества ресурсов и времени, а также подбора метода скрининга. Поэтому для поиска новых лигандов опухолевых клеток были использованы ДНК-кодированные библиотеки химических соединений, которые были впервые предложены Ричардом Лернером и Сиднеем Бреннером. Поиск новых соединений для CovCAR был проведен совместно с сотрудниками компании WuXi Apptec. ДНК-кодированные библиотеки компании WuXi состоят из более чем 50 миллиардов соединений, каждое из которых ковалентно связано с уникальной ДНК-меткой, служащей молекулярным штрихкодом. В результате обора были де-ново обнаружены новые молекулы, специфически связывающихся с PSMA и HER2. Конъюгация отобранных молекул с 1,3-дикетоном позволила получить низкомолекулярные адаптеры, которые направляли и контролировали активность CovCAR T клеток.

В диссертационной работе большое внимание уделялось улучшению и изучению CAR T клеток для гематологических заболеваний, которые составляют лишь часть раковых болезней. В свою очередь, для взрослых пациентов более актуальны и востребованы CAR T клетки для солидных опухолей. Однако, клинические испытания обнаружили, что CAR T клетки оказались либо малоэффективными, либо слишком токсичными, поскольку выбрать опухоль-специфический антиген крайне сложно. Многие солидные опухоли не обладают выражением уникальных, строго специфичных антигенов, характерных только для опухолевых клеток. Вместо этого они часто характеризуются гиперэкспрессией определённых мишеней или наличием их мутантных форм по сравнению с нормальными тканями. Для эффективной и безопасной иммунотерапии необходимо придать CAR T клеткам способность отличать опухолевые и здоровые клетки. Эту задачу можно решить с помощью адаптерных CAR T клеток и оптимизацией дозировки молекул-посредников, применения комбинации адаптеров или локальным введением адаптерных молекул.

С другой стороны, основной причиной низкой эффективности CAR T клеток для солидных опухолей является иммуносупрессивное микроокружение опухоли. В нашей

работе, для нарушения взаимодействия PD-1 с PD-L1, мы разработали внутриклеточный блокатор выхода PD-1 на поверхность CAR T клетки. В отличие от работ, в которых CAR T клетки секретируют анти-PD-1 и анти-PD-L1 антитела, в данной работе был использован подход внутриклеточного “захвата и удержания” PD-1, препятствующих его выходу на поверхность T клетки. С одной стороны, результаты цитотоксических тестов *in vitro* показали, что CAR T клетки становятся устойчивыми к ингибированию PD-L1. Вместе с тем мы обнаружили быструю потерю цитотоксической активности CAR T клеток без PD-1, которая сопровождалась повышенной активацией, быстрым созреванием и функциональным истощением T клеток. В результате CAR T клетки оказываются более чувствительными к стимуляции апоптоза в отсутствии сигналов, предоставляемых PD-1. Как ни парадоксально, оказалось, что отсутствие сигналов негативной регуляции на базальном уровне приводит к ухудшению выживаемости и значительному снижению функции CAR T-клеток *in vitro*. Дополнительно, нами было изучено влияние опухолевого микроокружения опухоли на эффективность адоптивной иммунотерапии, в частности иммуносупрессорная роль опухолевых внеклеточных экзосом и внеклеточной ДНК. Изучение особенностей взаимодействия экзосом с CAR T клетками привело нас к идее создания искусственных везикул, содержащие опухолевые антигены, добавление которых в культуру CAR T клеток оказывает положительное влияние на популяцию CAR-положительных клеток, активируя их и стимулируя пролиферацию *in vitro* и *in vivo*.

6 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.

7 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rosenberg S. A., Spiess P., Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes // *Science*. – 1986. – Т. 233, № 4770. – С. 1318-21.
2. Rosenberg S. A., Lotze M. T. Cancer immunotherapy using interleukin-2 and interleukin-2-activated lymphocytes // *Annu Rev Immunol*. – 1986. – Т. 4. – С. 681-709.
3. Sadelain M., Riviere I., Riddell S. Therapeutic T cell engineering // *Nature*. – 2017. – Т. 545, № 7655. – С. 423-431.
4. Sadelain M., Riviere I., Brentjens R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes // *Nat Rev Cancer*. – 2003. – Т. 3, № 1. – С. 35-45.
5. Sadelain M., Brentjens R., Riviere I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors // *Curr Opin Immunol*. – 2009. – Т. 21, № 2. – С. 215-23.
6. Neelapu S. S., Locke F. L., Bartlett N. L., Lekakis L. J., Miklos D. B., Jacobson C. A., Braunschweig I., Oluwole O. O., Siddiqi T., Lin Y., Timmerman J. M., Stiff P. J., Friedberg J. W., Flinn I. W., Goy A., Hill B. T., Smith M. R., Deol A., Farooq U., McSweeney P., Munoz J., Avivi I., Castro J. E., Westin J. R., Chavez J. C., Ghobadi A., Komanduri K. V., Levy R., Jacobsen E. D., Witzig T. E., Reagan P., Bot A., Rossi J., Navale L., Jiang Y., Aycock J., Elias M., Chang D., Wiecek J., Go W. Y. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma // *N Engl J Med*. – 2017. – Т. 377, № 26. – С. 2531-2544.
7. Gross G., Waks T., Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1989. – Т. 86, № 24. – С. 10024-8.
8. Eshhar Z., Waks T., Gross G., Schindler D. G. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1993. – Т. 90, № 2. – С. 720-4.
9. Kershaw M. H., Westwood J. A., Parker L. L., Wang G., Eshhar Z., Mavroukakis S. A., White D. E., Wunderlich J. R., Canevari S., Rogers-Freezer L., Chen C. C., Yang J. C., Rosenberg S. A., Hwu P. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer // *Clin Cancer Res*. – 2006. – Т. 12, № 20 Pt 1. – С. 6106-15.
10. Krause A., Guo H. F., Latouche J. B., Tan C., Cheung N. K., Sadelain M. Antigen-dependent CD28 signaling selectively enhances survival and proliferation in genetically modified activated human primary T lymphocytes // *J Exp Med*. – 1998. – Т. 188, № 4. – С. 619-26.

11. Imai C., Mihara K., Andreansky M., Nicholson I. C., Pui C. H., Geiger T. L., Campana D. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia // *Leukemia*. – 2004. – T. 18, № 4. – C. 676-84.
12. Weinkove R., George P., Dasyam N., McLellan A. D. Selecting costimulatory domains for chimeric antigen receptors: functional and clinical considerations // *Clin Transl Immunology*. – 2019. – T. 8, № 5. – C. e1049.
13. van der Stegen S. J., Hamieh M., Sadelain M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors // *Nat Rev Drug Discov*. – 2015. – T. 14, № 7. – C. 499-509.
14. Kawalekar O. U., O'Connor R. S., Fraietta J. A., Guo L., McGettigan S. E., Posey A. D., Jr., Patel P. R., Guedan S., Scholler J., Keith B., Snyder N. W., Blair I. A., Milone M. C., June C. H. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells // *Immunity*. – 2016. – T. 44, № 2. – C. 380-90.
15. Ramos C. A., Rouce R., Robertson C. S., Reyna A., Narala N., Vyas G., Mehta B., Zhang H., Dakhova O., Carrum G., Kamble R. T., Gee A. P., Mei Z., Wu M. F., Liu H., Grilley B., Rooney C. M., Heslop H. E., Brenner M. K., Savoldo B., Dotti G. In Vivo Fate and Activity of Second-versus Third-Generation CD19-Specific CAR-T Cells in B Cell Non-Hodgkin's Lymphomas // *Mol Ther*. – 2018. – T. 26, № 12. – C. 2727-2737.
16. Hombach A. A., Heiders J., Foppe M., Chmielewski M., Abken H. OX40 costimulation by a chimeric antigen receptor abrogates CD28 and IL-2 induced IL-10 secretion by redirected CD4(+) T cells // *Oncoimmunology*. – 2012. – T. 1, № 4. – C. 458-466.
17. Shen C. J., Yang Y. X., Han E. Q., Cao N., Wang Y. F., Wang Y., Zhao Y. Y., Zhao L. M., Cui J., Gupta P., Wong A. J., Han S. Y. Chimeric antigen receptor containing ICOS signaling domain mediates specific and efficient antitumor effect of T cells against EGFRvIII expressing glioma // *J Hematol Oncol*. – 2013. – T. 6. – C. 33.
18. Song D. G., Ye Q., Poussin M., Harms G. M., Figini M., Powell D. J., Jr. CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells in vivo // *Blood*. – 2012. – T. 119, № 3. – C. 696-706.
19. Roselli E., Faramand R., Davila M. L. Insight into next-generation CAR therapeutics: designing CAR T cells to improve clinical outcomes // *J Clin Invest*. – 2021. – T. 131, № 2.
20. Imbimbo M., Wetterwald L., Friedlaender A., Parikh K., Addeo A. Cellular Therapy in NSCLC: Between Myth and Reality // *Curr Oncol Rep*. – 2023. – T. 25, № 10. – C. 1161-1174.
21. Yeku O. O., Brentjens R. J. Armored CAR T-cells: utilizing cytokines and pro-inflammatory ligands to enhance CAR T-cell anti-tumour efficacy // *Biochem Soc Trans*. – 2016. – T. 44, № 2. – C. 412-8.

22. Pegram H. J., Purdon T. J., van Leeuwen D. G., Curran K. J., Giralt S. A., Barker J. N., Brentjens R. J. IL-12-secreting CD19-targeted cord blood-derived T cells for the immunotherapy of B-cell acute lymphoblastic leukemia // *Leukemia*. – 2015. – T. 29, № 2. – C. 415-22.
23. Tokarew N., Ogonek J., Endres S., von Bergwelt-Baildon M., Kobold S. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells // *Br J Cancer*. – 2019. – T. 120, № 1. – C. 26-37.
24. Hawkins E. R., D'Souza R. R., Klampatsa A. Armored CAR T-Cells: The Next Chapter in T-Cell Cancer Immunotherapy // *Biologics*. – 2021. – T. 15. – C. 95-105.
25. Yu S., Li A., Liu Q., Li T., Yuan X., Han X., Wu K. Chimeric antigen receptor T cells: a novel therapy for solid tumors // *J Hematol Oncol*. – 2017. – T. 10, № 1. – C. 78.
26. Chmielewski M., Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs // *Expert Opin Biol Ther*. – 2015. – T. 15, № 8. – C. 1145-54.
27. Hosseinkhani N., Derakhshani A., Kooshkaki O., Abdoli Shadbad M., Hajiasgharzadeh K., Baghbanzadeh A., Safarpour H., Mokhtarzadeh A., Brunetti O., Yue S. C., Silvestris N., Baradaran B. Immune Checkpoints and CAR-T Cells: The Pioneers in Future Cancer Therapies? // *Int J Mol Sci*. – 2020. – T. 21, № 21.
28. Kagoya Y., Tanaka S., Guo T., Anczurowski M., Wang C. H., Saso K., Butler M. O., Minden M. D., Hirano N. A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects // *Nat Med*. – 2018. – T. 24, № 3. – C. 352-359.
29. Salter A. I., Rajan A., Kennedy J. J., Ivey R. G., Shelby S. A., Leung I., Templeton M. L., Muhunthan V., Voillet V., Sommermeyer D., Whiteaker J. R., Gottardo R., Veatch S. L., Paulovich A. G., Riddell S. R. Comparative analysis of TCR and CAR signaling informs CAR designs with superior antigen sensitivity and in vivo function // *Sci Signal*. – 2021. – T. 14, № 697.
30. Wu L., Wei Q., Brzostek J., Gascoigne N. R. J. Signaling from T cell receptors (TCRs) and chimeric antigen receptors (CARs) on T cells // *Cell Mol Immunol*. – 2020. – T. 17, № 6. – C. 600-612.
31. Barden M., Holzinger A., Velas L., Mezosi-Csaplár M., Szoor A., Vereb G., Schutz G. J., Hombach A. A., Abken H. CAR and TCR form individual signaling synapses and do not cross-activate, however, can co-operate in T cell activation // *Front Immunol*. – 2023. – T. 14. – C. 1110482.
32. Yun K., Siegler E. L., Kenderian S. S. Who wins the combat, CAR or TCR? // *Leukemia*. – 2023. – T. 37, № 10. – C. 1953-1962.
33. Feucht J., Sun J., Eyquem J., Ho Y. J., Zhao Z., Leibold J., Dobrin A., Cabriolu A., Hamieh M., Sadelain M. Calibration of CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency // *Nat Med*. – 2019. – T. 25, № 1. – C. 82-88.

34. Wu W., Zhou Q., Masubuchi T., Shi X., Li H., Xu X., Huang M., Meng L., He X., Zhu H., Gao S., Zhang N., Jing R., Sun J., Wang H., Hui E., Wong C. C., Xu C. Multiple Signaling Roles of CD3epsilon and Its Application in CAR-T Cell Therapy // *Cell*. – 2020. – T. 182, № 4. – C. 855-871 e23.
35. Maude S. L., Laetsch T. W., Buechner J., Rives S., Boyer M., Bittencourt H., Bader P., Verneris M. R., Stefanski H. E., Myers G. D., Qayed M., De Moerloose B., Hiramatsu H., Schlis K., Davis K. L., Martin P. L., Nemecek E. R., Yanik G. A., Peters C., Baruchel A., Boissel N., Mechinaud F., Balduzzi A., Krueger J., June C. H., Levine B. L., Wood P., Taran T., Leung M., Mueller K. T., Zhang Y., Sen K., Lebwohl D., Pulsipher M. A., Grupp S. A. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia // *N Engl J Med*. – 2018. – T. 378, № 5. – C. 439-448.
36. Berdeja J. G., Madduri D., Usmani S. Z., Jakubowiak A., Agha M., Cohen A. D., Stewart A. K., Hari P., Htut M., Lesokhin A., Deol A., Munshi N. C., O'Donnell E., Avigan D., Singh I., Zudaire E., Yeh T. M., Allred A. J., Olyslager Y., Banerjee A., Jackson C. C., Goldberg J. D., Schechter J. M., Deraedt W., Zhuang S. H., Infante J., Geng D., Wu X., Carrasco-Alfonso M. J., Akram M., Hossain F., Rizvi S., Fan F., Lin Y., Martin T., Jagannath S. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study // *Lancet*. – 2021. – T. 398, № 10297. – C. 314-324.
37. Munshi N. C., Anderson L. D., Jr., Shah N., Madduri D., Berdeja J., Lonial S., Raje N., Lin Y., Siegel D., Oriol A., Moreau P., Yakoub-Agha I., Delforge M., Cavo M., Einsele H., Goldschmidt H., Weisel K., Rambaldi A., Reece D., Petrocca F., Massaro M., Connarn J. N., Kaiser S., Patel P., Huang L., Campbell T. B., Hege K., San-Miguel J. Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma // *N Engl J Med*. – 2021. – T. 384, № 8. – C. 705-716.
38. Abramson J. S., Palomba M. L., Gordon L. I., Lunning M. A., Wang M., Arnason J., Mehta A., Purev E., Maloney D. G., Andreadis C., Sehgal A., Solomon S. R., Ghosh N., Albertson T. M., Garcia J., Kostic A., Mallaney M., Ogasawara K., Newhall K., Kim Y., Li D., Siddiqi T. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study // *Lancet*. – 2020. – T. 396, № 10254. – C. 839-852.
39. Spiegel J. Y., Patel S., Muffly L., Hossain N. M., Oak J., Baird J. H., Frank M. J., Shiraz P., Sahaf B., Craig J., Iglesias M., Younes S., Natkunam Y., Ozawa M. G., Yang E., Tamaresis J., Chinnasamy H., Ehlinger Z., Reynolds W., Lynn R., Rotiroti M. C., Gkitsas N., Arai S., Johnston L., Lowsky R., Majzner R. G., Meyer E., Negrin R. S., Rezvani A. R., Sidana S.,

- Shizuru J., Weng W. K., Mullins C., Jacob A., Kirsch I., Bazzano M., Zhou J., Mackay S., Bornheimer S. J., Schultz L., Ramakrishna S., Davis K. L., Kong K. A., Shah N. N., Qin H., Fry T., Feldman S., Mackall C. L., Miklos D. B. CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in adult patients with recurrent or refractory B cell malignancies: a phase 1 trial // *Nat Med.* – 2021. – T. 27, № 8. – C. 1419-1431.
40. Shah N. N., Johnson B. D., Schneider D., Zhu F., Szabo A., Keever-Taylor C. A., Krueger W., Worden A. A., Kadan M. J., Yim S., Cunningham A., Hamadani M., Fenske T. S., Dropulic B., Orentas R., Hari P. Bispecific anti-CD20, anti-CD19 CAR T cells for relapsed B cell malignancies: a phase 1 dose escalation and expansion trial // *Nat Med.* – 2020. – T. 26, № 10. – C. 1569-1575.
41. Levine B. L., Miskin J., Wonnacott K., Keir C. Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy // *Mol Ther Methods Clin Dev.* – 2017. – T. 4. – C. 92-101.
42. Kedmi M., Shouval R., Fried S., Bomze D., Fein J., Cohen Z., Danilesko I., Shem-Tov N., Yerushalmi R., Jacoby E., Besser M., Shimoni A., Nagler A., Avigdor A. Point-of-care anti-CD19 CAR T-cells for treatment of relapsed and refractory aggressive B-cell lymphoma // *Transplant Cell Ther.* – 2022. – T. 28, № 5. – C. 251-257.
43. Maschan M., Caimi P. F., Reese-Koc J., Sanchez G. P., Sharma A. A., Molostova O., Shelikhova L., Pershin D., Stepanov A., Muzalevskii Y., Suzart V. G., 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 R. P., de Lima M., Dropulic B. Multiple site place-of-care manufactured anti-CD19 CAR-T cells induce high remission rates in B-cell malignancy patients // *Nat Commun.* – 2021. – T. 12, № 1. – C. 7200.
44. Fesnak A., Lin C., Siegel D. L., Maus M. V. CAR-T Cell Therapies From the Transfusion Medicine Perspective // *Transfus Med Rev.* – 2016. – T. 30, № 3. – C. 139-45.
45. Ortiz-Maldonado V., Rives S., Castella M., Alonso-Saladrigues A., Benitez-Ribas D., Caballero-Banos M., Baumann T., Cid J., Garcia-Rey E., Llanos C., Torreadell M., Villamor N., Gine E., Diaz-Beya M., Guardia L., Montoro M., Catala A., Faura A., Gonzalez E. A., Espanol-Rego M., Klein-Gonzalez N., Alsina L., Castro P., Jordan I., Fernandez S., Ramos F., Sune G., Perpina U., Canals J. M., Lozano M., Trias E., Scalise A., Varea S., Saez-Penataro J., Torres F., Calvo G., Esteve J., Urbano-Ispizua A., Juan M., Delgado J. CART19-BE-01: A Multicenter Trial of ARI-0001 Cell Therapy in Patients with CD19(+) Relapsed/Refractory Malignancies // *Mol Ther.* – 2021. – T. 29, № 2. – C. 636-644.
46. Allen E. S., Stroncek D. F., Ren J., Eder A. F., West K. A., Fry T. J., Lee D. W., Mackall C. L., Conry-Cantilena C. Autologous lymphapheresis for the production of chimeric antigen receptor T cells // *Transfusion.* – 2017. – T. 57, № 5. – C. 1133-1141.

47. Shah M., Krull A., Odonnell L., de Lima M. J., Bezerra E. Promises and challenges of a decentralized CAR T-cell manufacturing model // *Front Transplant.* – 2023. – T. 2. – C. 1238535.
48. Boettcher M., Joechner A., Li Z., Yang S. F., Schlegel P. Development of CAR T Cell Therapy in Children-A Comprehensive Overview // *J Clin Med.* – 2022. – T. 11, № 8.
49. Wang M., Munoz J., Goy A., Locke F. L., Jacobson C. A., Hill B. T., Timmerman J. M., Holmes H., Jaglowski S., Flinn I. W., McSweeney P. A., Miklos D. B., Pagel J. M., Kersten M. J., Milpied N., Fung H., Topp M. S., Houot R., Beitinjaneh A., Peng W., Zheng L., Rossi J. M., Jain R. K., Rao A. V., Reagan P. M. KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma // *N Engl J Med.* – 2020. – T. 382, № 14. – C. 1331-1342.
50. Abou-El-Enein M., Elsallab M., Feldman S. A., Fesnak A. D., Heslop H. E., Marks P., Till B. G., Bauer G., Savoldo B. Scalable Manufacturing of CAR T cells for Cancer Immunotherapy // *Blood Cancer Discov.* – 2021. – T. 2, № 5. – C. 408-422.
51. Lam C., Meinert E., Yang A., Cui Z. Comparison between centralized and decentralized supply chains of autologous chimeric antigen receptor T-cell therapies: a UK case study based on discrete event simulation // *Cytotherapy.* – 2021. – T. 23, № 5. – C. 433-451.
52. Palani H. K., Arunachalam A. K., Yasar M., Venkatraman A., Kulkarni U., Lionel S. A., Selvarajan S., Korula A., Abraham A., George B., Adair J. E., Orentas R., Dropulic B., Mathews V. Decentralized manufacturing of anti CD19 CAR-T cells using CliniMACS Prodigy(R): real-world experience and cost analysis in India // *Bone Marrow Transplant.* – 2023. – T. 58, № 2. – C. 160-167.
53. Ramakrishnan S., Kumar J., Datta S. S., Radhakrishnan V., Nair R., Chandy M. Should we adopt an automated de-centralized model of chimeric antigen receptor- T cells manufacturing for low-and middle-income countries? A real world perspective // *Front Oncol.* – 2022. – T. 12. – C. 1062296.
54. Jackson Z., Roe A., Sharma A. A., Lopes F., Talla A., Kleinsorge-Block S., Zamborsky K., Schiavone J., Manjappa S., Schauner R., Lee G., Liu R., Caimi P. F., Xiong Y., Krueger W., Worden A., Kadan M., Schneider D., Orentas R., Dropulic B., Sekaly R. P., de Lima M., Wald D. N., Reese J. S. Automated Manufacture of Autologous CD19 CAR-T Cells for Treatment of Non-hodgkin Lymphoma // *Front Immunol.* – 2020. – T. 11. – C. 1941.
55. Kochenderfer J. N., Dudley M. E., Feldman S. A., Wilson W. H., Spaner D. E., Maric I., Stetler-Stevenson M., Phan G. Q., Hughes M. S., Sherry R. M., Yang J. C., Kammula U. S., Devillier L., Carpenter R., Nathan D. A., Morgan R. A., Laurencot C., Rosenberg S. A. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial

- of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells // *Blood*. – 2012. – T. 119, № 12. – C. 2709-20.
56. Brentjens R. J., Riviere I., Park J. H., Davila M. L., Wang X., Stefanski J., Taylor C., Yeh R., Bartido S., Borquez-Ojeda O., Olszewska M., Bernal Y., Pegram H., Przybylowski M., Hollyman D., Usachenko Y., Pirraglia D., Hosey J., Santos E., Halton E., Maslak P., Scheinberg D., Jurcic J., Heaney M., Heller G., Frattini M., Sadelain M. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias // *Blood*. – 2011. – T. 118, № 18. – C. 4817-28.
57. Till B. G., Jensen M. C., Wang J., Chen E. Y., Wood B. L., Greisman H. A., Qian X., James S. E., Raubitschek A., Forman S. J., Gopal A. K., Pagel J. M., Lindgren C. G., Greenberg P. D., Riddell S. R., Press O. W. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells // *Blood*. – 2008. – T. 112, № 6. – C. 2261-71.
58. Kochenderfer J. N., Wilson W. H., Janik J. E., Dudley M. E., Stetler-Stevenson M., Feldman S. A., Maric I., Raffeld M., Nathan D. A., Lanier B. J., Morgan R. A., Rosenberg S. A. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19 // *Blood*. – 2010. – T. 116, № 20. – C. 4099-102.
59. Porter D. L., Levine B. L., Kalos M., Bagg A., June C. H. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia // *N Engl J Med*. – 2011. – T. 365, № 8. – C. 725-33.
60. Zhu F., Shah N., Xu H., Schneider D., Orentas R., Dropulic B., Hari P., Keever-Taylor C. A. Closed-system manufacturing of CD19 and dual-targeted CD20/19 chimeric antigen receptor T cells using the CliniMACS Prodigy device at an academic medical center // *Cytotherapy*. – 2018. – T. 20, № 3. – C. 394-406.
61. Nicod C., da Rocha M. N., Warda W., Roussel X., Haderbache R., Seffar E., Trad R., Bouquet L., Goncalves M., Bosdure L., Laude M. C., Guiot M., Ferrand C., Deschamps M. CAR-T cells targeting IL-1RAP produced in a closed semiautomatic system are ready for the first phase I clinical investigation in humans // *Curr Res Transl Med*. – 2023. – T. 71, № 2. – C. 103385.
62. Kekre N., Hay K. A., Webb J. R., Mallick R., Balasundaram M., Sigrist M. K., Clement A. M., Nielsen J. S., Quizi J., Yung E., Brown S. D., Dreolini L., Waller D. D., Smazynski J., Gierc N. S., Loveless B. C., Clark K., Dyer T., Hogg R., McCormick L., Gignac M., Bell S., Chapman D. M., Bond D., Yong S., Fung R., Lockyer H. M., Hodgson V., Murphy C., Subramanian A., Wiebe E., Yoganathan P., Medynski L., Vaillan D. C., Black A., McDiarmid S., Kennah M., Hamelin L., Song K., Narayanan S., Rodrigo J. A., Dupont S., Hawrysh T., Presseau J., Thavorn

- K., Lalu M. M., Fergusson D. A., Bell J. C., Atkins H., Nelson B. H., Holt R. A. CLIC-01: Manufacture and distribution of non-cryopreserved CAR-T cells for patients with CD19 positive hematologic malignancies // *Front Immunol.* – 2022. – T. 13. – C. 1074740.
63. Kim H., Kim S., Lim H., Chung A. J. Expanding CAR-T cell immunotherapy horizons through microfluidics // *Lab Chip.* – 2024. – T. 24, № 5. – C. 1088-1120.
64. Dourthe M. E., Rabian F., Yakouben K., Chevillon F., Cabannes-Hamy A., Mechinaud F., Grain A., Chaillou D., Rahal I., Caillat-Zucman S., Lesprit E., Naudin J., Roupret-Serzec J., Parquet N., Brignier A., Guerin-El Khourouj V., Lainey E., Caye-Eude A., Cave H., Clappier E., Mathis S., Azoulay E., Dalle J. H., Dhedin N., Madelaine I., Larghero J., Boissel N., Baruchel A. Determinants of CD19-positive vs CD19-negative relapse after tisagenlecleucel for B-cell acute lymphoblastic leukemia // *Leukemia.* – 2021. – T. 35, № 12. – C. 3383-3393.
65. Cappell K. M., Kochenderfer J. N. Long-term outcomes following CAR T cell therapy: what we know so far // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2023. – T. 20, № 6. – C. 359-371.
66. Pillai V., Muralidharan K., Meng W., Bagashev A., Oldridge D. A., Rosenthal J., Van Arnam J., Melenhorst J. J., Mohan D., DiNofia A. M., Luo M., Cherian S., Fromm J. R., Wertheim G., Thomas-Tikhonenko A., Paessler M., June C. H., Luning Prak E. T., Bhoj V. G., Grupp S. A., Maude S. L., Rheingold S. R. CAR T-cell therapy is effective for CD19-dim B-lymphoblastic leukemia but is impacted by prior blinatumomab therapy // *Blood Adv.* – 2019. – T. 3, № 22. – C. 3539-3549.
67. Baguet C., Larghero J., Mebarki M. Early predictive factors of failure in autologous CAR T-cell manufacturing and/or efficacy in hematologic malignancies // *Blood Adv.* – 2024. – T. 8, № 2. – C. 337-342.
68. Hoffmann J. M., Schubert M. L., Wang L., Huckelhoven A., Sellner L., Stock S., Schmitt A., Kleist C., Gern U., Loskog A., Wuchter P., Hofmann S., Ho A. D., Muller-Tidow C., Dreger P., Schmitt M. Differences in Expansion Potential of Naive Chimeric Antigen Receptor T Cells from Healthy Donors and Untreated Chronic Lymphocytic Leukemia Patients // *Front Immunol.* – 2017. – T. 8. – C. 1956.
69. Davila M. L., Riviere I., Wang X., Bartido S., Park J., Curran K., Chung S. S., Stefanski J., Borquez-Ojeda O., Olszewska M., Qu J., Wasielewska T., He Q., Fink M., Shinglot H., Youssif M., Satter M., Wang Y., Hosey J., Quintanilla H., Halton E., Bernal Y., Bouhassira D. C., Arcila M. E., Gonen M., Roboz G. J., Maslak P., Douer D., Frattini M. G., Giralto S., Sadelain M., Brentjens R. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia // *Sci Transl Med.* – 2014. – T. 6, № 224. – C. 224ra25.

70. Zhang D. K. Y., Adu-Berchie K., Iyer S., Liu Y., Cieri N., Brockman J. M., Neuberger D., Wu C. J., Mooney D. J. Enhancing CAR-T cell functionality in a patient-specific manner // *Nat Commun.* – 2023. – T. 14, № 1. – C. 506.
71. Fraietta J. A., Lacey S. F., Orlando E. J., Pruteanu-Malinici I., Gohil M., Lundh S., Boesteanu A. C., Wang Y., O'Connor R. S., Hwang W. T., Pequignot E., Ambrose D. E., Zhang C., Wilcox N., Bedoya F., Dorfmeier C., Chen F., Tian L., Parakandi H., Gupta M., Young R. M., Johnson F. B., Kulikovskaya I., Liu L., Xu J., Kassim S. H., Davis M. M., Levine B. L., Frey N. V., Siegel D. L., Huang A. C., Wherry E. J., Bitter H., Brogdon J. L., Porter D. L., June C. H., Melenhorst J. J. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia // *Nat Med.* – 2018. – T. 24, № 5. – C. 563-571.
72. Sommermeier D., Hudecek M., Kosasih P. L., Gogishvili T., Maloney D. G., Turtle C. J., Riddell S. R. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8⁺ and CD4⁺ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo // *Leukemia.* – 2016. – T. 30, № 2. – C. 492-500.
73. Siddiqi T., Maloney D. G., Kenderian S. S., Brander D. M., Dorritie K., Soumerai J., Riedell P. A., Shah N. N., Nath R., Fakhri B., Stephens D. M., Ma S., Feldman T., Solomon S. R., Schuster S. J., Perna S. K., Tuazon S. A., Ou S. S., Papp E., Peiser L., Chen Y., Wierda W. G. Lisocabtagene maraleucel in chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma (TRANSCEND CLL 004): a multicentre, open-label, single-arm, phase 1-2 study // *Lancet.* – 2023. – T. 402, № 10402. – C. 641-654.
74. Abecassis A., Roders N., Fayon M., Choisy C., Nelson E., Harel S., Royer B., Villesuzanne C., Talbot A., Garrick D., Goodhardt M., Femand J. P., Burbidge M., Arnulf B., Bories J. C. CAR-T cells derived from multiple myeloma patients at diagnosis have improved cytotoxic functions compared to those produced at relapse or following daratumumab treatment // *EJHaem.* – 2022. – T. 3, № 3. – C. 970-974.
75. Turtle C. J., Hanafi L. A., Berger C., Gooley T. A., Cherian S., Hudecek M., Sommermeier D., Melville K., Pender B., Budiarto T. M., Robinson E., Steevens N. N., Chaney C., Soma L., Chen X., Yeung C., Wood B., Li D., Cao J., Heimfeld S., Jensen M. C., Riddell S. R., Maloney D. G. CD19 CAR-T cells of defined CD4⁺:CD8⁺ composition in adult B cell ALL patients // *J Clin Invest.* – 2016. – T. 126, № 6. – C. 2123-38.
76. Wherry E. J., Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion // *Nat Rev Immunol.* – 2015. – T. 15, № 8. – C. 486-99.

77. Zhou J., Jin L., Wang F., Zhang Y., Liu B., Zhao T. Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells expanded with IL-7/IL-15 mediate superior antitumor effects // *Protein Cell.* – 2019. – T. 10, № 10. – C. 764-769.
78. Alizadeh D., Wong R. A., Yang X., Wang D., Pecoraro J. R., Kuo C. F., Aguilar B., Qi Y., Ann D. K., Starr R., Urak R., Wang X., Forman S. J., Brown C. E. IL15 Enhances CAR-T Cell Antitumor Activity by Reducing mTORC1 Activity and Preserving Their Stem Cell Memory Phenotype // *Cancer Immunol Res.* – 2019. – T. 7, № 5. – C. 759-772.
79. Poorebrahim M., Melief J., Pico de Coana Y., S L. W., Cid-Arregui A., Kiessling R. Counteracting CAR T cell dysfunction // *Oncogene.* – 2021. – T. 40, № 2. – C. 421-435.
80. Locke F. L., Rossi J. M., Neelapu S. S., Jacobson C. A., Miklos D. B., Ghobadi A., Oluwole O. O., Reagan P. M., Lekakis L. J., Lin Y., Sherman M., Better M., Go W. Y., Wiecek J. S., Xue A., Bot A. Tumor burden, inflammation, and product attributes determine outcomes of axicabtagene ciloleucel in large B-cell lymphoma // *Blood Adv.* – 2020. – T. 4, № 19. – C. 4898-4911.
81. Xu Y., Zhang M., Ramos C. A., Durett A., Liu E., Dakhova O., Liu H., Creighton C. J., Gee A. P., Heslop H. E., Rooney C. M., Savoldo B., Dotti G. Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR.CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15 // *Blood.* – 2014. – T. 123, № 24. – C. 3750-9.
82. Singh N., Perazzelli J., Grupp S. A., Barrett D. M. Early memory phenotypes drive T cell proliferation in patients with pediatric malignancies // *Sci Transl Med.* – 2016. – T. 8, № 320. – C. 320ra3.
83. Kishton R. J., Sukumar M., Restifo N. P. Metabolic Regulation of T Cell Longevity and Function in Tumor Immunotherapy // *Cell Metab.* – 2017. – T. 26, № 1. – C. 94-109.
84. Ghassemi S., Durgin J. S., Nunez-Cruz S., Patel J., Leferovich J., Pinzone M., Shen F., Cummins K. D., Plesa G., Cantu V. A., Reddy S., Bushman F. D., Gill S. I., O'Doherty U., O'Connor R. S., Milone M. C. Rapid manufacturing of non-activated potent CAR T cells // *Nat Biomed Eng.* – 2022. – T. 6, № 2. – C. 118-128.
85. Grupp S. A., Kalos M., Barrett D., Aplenc R., Porter D. L., Rheingold S. R., Teachey D. T., Chew A., Hauck B., Wright J. F., Milone M. C., Levine B. L., June C. H. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia // *N Engl J Med.* – 2013. – T. 368, № 16. – C. 1509-1518.
86. Savoldo B., Ramos C. A., Liu E., Mims M. P., Keating M. J., Carrum G., Kamble R. T., Bollard C. M., Gee A. P., Mei Z., Liu H., Grilley B., Rooney C. M., Heslop H. E., Brenner M. K., Dotti G. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen

- receptor-modified T cells in lymphoma patients // *J Clin Invest.* – 2011. – T. 121, № 5. – C. 1822-6.
87. Beltra J. C., Bourbonnais S., Bedard N., Charpentier T., Boulange M., Michaud E., Boufaied I., Bruneau J., Shoukry N. H., Lamarre A., Decaluwe H. IL2Rbeta-dependent signals drive terminal exhaustion and suppress memory development during chronic viral infection // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2016. – T. 113, № 37. – C. E5444-53.
88. Niederlova V., Tsyklauri O., Kovar M., Stepanek O. IL-2-driven CD8(+) T cell phenotypes: implications for immunotherapy // *Trends Immunol.* – 2023. – T. 44, № 11. – C. 890-901.
89. Riddell S. R., Greenberg P. D. The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells // *J Immunol Methods.* – 1990. – T. 128, № 2. – C. 189-201.
90. Trickett A., Kwan Y. L. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads // *J Immunol Methods.* – 2003. – T. 275, № 1-2. – C. 251-5.
91. Zhang D. K. Y., Cheung A. S., Mooney D. J. Activation and expansion of human T cells using artificial antigen-presenting cell scaffolds // *Nat Protoc.* – 2020. – T. 15, № 3. – C. 773-798.
92. Appel H., Seth N. P., Gauthier L., Wucherpfennig K. W. Anergy induction by dimeric TCR ligands // *J Immunol.* – 2001. – T. 166, № 8. – C. 5279-85.
93. Kagoya Y., Nakatsugawa M., Ochi T., Cen Y., Guo T., Anczurowski M., Saso K., Butler M. O., Hirano N. Transient stimulation expands superior antitumor T cells for adoptive therapy // *JCI Insight.* – 2017. – T. 2, № 2. – C. e89580.
94. Alarcon B., Mestre D., Martinez-Martin N. The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering? // *Immunology.* – 2011. – T. 133, № 4. – C. 420-5.
95. Morita D., Nishio N., Saito S., Tanaka M., Kawashima N., Okuno Y., Suzuki S., Matsuda K., Maeda Y., Wilson M. H., Dotti G., Rooney C. M., Takahashi Y., Nakazawa Y. Enhanced Expression of Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor in piggyBac Transposon-Engineered T Cells // *Mol Ther Methods Clin Dev.* – 2018. – T. 8. – C. 131-140.
96. Oelke M., Maus M. V., Didiano D., June C. H., Mackensen A., Schneck J. P. Ex vivo induction and expansion of antigen-specific cytotoxic T cells by HLA-Ig-coated artificial antigen-presenting cells // *Nat Med.* – 2003. – T. 9, № 5. – C. 619-24.
97. Kebriaei P., Singh H., Huls M. H., Figliola M. J., Bassett R., Olivares S., Jena B., Dawson M. J., Kumaresan P. R., Su S., Maiti S., Dai J., Moriarity B., Forget M. A., Senyukov V., Orozco A., Liu T., McCarty J., Jackson R. N., Moyes J. S., Rondon G., Qazilbash M., Ciurea S., Alousi A., Nieto Y., Rezvani K., Marin D., Popat U., Hosing C., Shpall E. J., Kantarjian H., Keating M., Wierda W., Do K. A., Largaespada D. A., Lee D. A., Hackett P. B., Champlin R. E., Cooper L.

- J. Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells // *J Clin Invest.* – 2016. – T. 126, № 9. – C. 3363-76.
98. Maus M. V., Thomas A. K., Leonard D. G., Allman D., Addya K., Schlienger K., Riley J. L., June C. H. Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB // *Nat Biotechnol.* – 2002. – T. 20, № 2. – C. 143-8.
99. Earl L. A., Baum L. G. CD45 Glycosylation controls T-cell life and death // *Immunol. Cell Biol.* – 2008. – T. 86, № 7. – C. 608-615.
100. Lynch K. W., Weiss A. A CD45 polymorphism associated with multiple sclerosis disrupts an exonic splicing silencer // *J. Biol. Chem.* – 2001. – T. 276, № 26. – C. 24341-24347.
101. Tong A., Nguyen J., Lynch K. W. Differential expression of CD45 isoforms is controlled by the combined activity of basal and inducible splicing-regulatory elements in each of the variable exons // *J. Biol. Chem.* – 2005. – T. 280, № 46. – C. 38297-38304.
102. Nam H.-J., Poy F., Saito H., Frederick C. A. Structural basis for the function and regulation of the receptor protein tyrosine phosphatase CD45 // *J. Exp. Med.* – 2005. – T. 201, № 3. – C. 441-452.
103. Kashio N., Matsumoto W., Parker S., Rothstein D. M. The second domain of the CD45 protein tyrosine phosphatase is critical for interleukin-2 secretion and substrate recruitment of TCR- ζ in vivo // *J. Biol. Chem.* – 1998. – T. 273, № 50. – C. 33856-33863.
104. Volkov D. V., Stepanova V. M., Rubtsov Y. P., Stepanov A. V., Gabibov A. G. Protein Tyrosine Phosphatase CD45 As an Immunity Regulator and a Potential Effector of CAR-T therapy // *Acta Naturae.* – 2023. – T. 15, № 3. – C. 17-26.
105. Zikherman J., Jenne C., Watson S., Doan K., Raschke W., Goodnow C. C., Weiss A. CD45-Csk phosphatase-kinase titration uncouples basal and inducible T cell receptor signaling during thymic development // *Immunity.* – 2010. – T. 32, № 3. – C. 342-354.
106. Trowbridge I. S., Thomas M. L. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development // *Annu. Rev. Immunol.* – 1994. – T. 12, № 1. – C. 85-116.
107. D'Oro U., Sakaguchi K., Appella E., Ashwell J. D. Mutational analysis of Lck in CD45-negative T cells: dominant role of tyrosine 394 phosphorylation in kinase activity // *Mol. Cell. Biol.* – 1996. – T. 16, № 9. – C. 4996-5003.
108. Parsons S. J., Parsons J. T. Src family kinases, key regulators of signal transduction // *Oncogene.* – 2004. – T. 23, № 48. – C. 7906-7909.

109. Castro-Sanchez P., Teagle A. R., Prade S., Zamoyska R. Modulation of TCR signaling by tyrosine phosphatases: From autoimmunity to immunotherapy // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2020. – T. 8. – C. 608747.
110. Lee K.-Y., Rhim J.-W., Kang J.-H. Hyperactive immune cells (T cells) may be responsible for acute lung injury in influenza virus infections: a need for early immune-modulators for severe cases // *Med. Hypotheses.* – 2011. – T. 76, № 1. – C. 64-69.
111. Bhojwani D., Pui C. H. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia // *Lancet Oncol.* – 2013. – T. 14, № 6. – C. e205-17.
112. Raetz E. A., Bhatla T. Where do we stand in the treatment of relapsed acute lymphoblastic leukemia? // *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* – 2012. – T. 2012. – C. 129-36.
113. Forman S. J., Rowe J. M. The myth of the second remission of acute leukemia in the adult // *Blood.* – 2013. – T. 121, № 7. – C. 1077-82.
114. Wang Y. X., Li Y. H. [Efficacy of Donor Lymphocyte Infusion for Treating Relapsed High-Risk Leukemia patients after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation] // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* – 2015. – T. 23, № 4. – C. 982-8.
115. Tambaro F. P., Singh H., Jones E., Rytting M., Mahadeo K. M., Thompson P., Daver N., DiNardo C., Kadia T., Garcia-Manero G., Chan T., Shah R. R., Wierda W. G. Autologous CD33-CAR-T cells for treatment of relapsed/refractory acute myelogenous leukemia // *Leukemia.* – 2021. – T. 35, № 11. – C. 3282-3286.
116. Gattinoni L., Speiser D. E., Lichterfeld M., Bonini C. T memory stem cells in health and disease // *Nat. Med.* – 2017. – T. 23, № 1. – C. 18-27.
117. Arstila T. P., Casrouge A., Baron V. r., Even J., Kanellopoulos J., Kourilsky P. A direct estimate of the human $\alpha\beta$ T cell receptor diversity // *Science.* – 1999. – T. 286, № 5441. – C. 958-961.
118. Robins H. S., Campregher P. V., Srivastava S. K., Wachter A., Turtle C. J., Kahsai O., Riddell S. R., Warren E. H., Carlson C. S. Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells // *Blood.* – 2009. – T. 114, № 19. – C. 4099-4107.
119. Anderson B. E., McNiff J., Yan J., Doyle H., Mamula M., Shlomchik M. J., Shlomchik W. D. Memory CD4⁺ T cells do not induce graft-versus-host disease // *J. Clin. Invest.* – 2003. – T. 112, № 1. – C. 101-108.
120. Zhang Y., Joe G., Zhu J., Carroll R., Levine B., Hexner E., June C., Emerson S. G. Dendritic cell-activated CD44^{hi}CD8⁺ T cells are defective in mediating acute graft-versus-host disease but retain graft-versus-leukemia activity // *Blood.* – 2004. – T. 103, № 10. – C. 3970-3978.

121. Chen B. J., Cui X., Sempowski G. D., Liu C., Chao N. J. Transfer of allogeneic CD62L-memory T cells without graft-versus-host disease // *Blood*. – 2004. – T. 103, № 4. – C. 1534-1541.
122. Dutt S., Tseng D., Ermann J., George T. I., Liu Y. P., Davis C. R., Fathman C. G., Strober S. Naive and memory T cells induce different types of graft-versus-host disease // *J. Immunol.* – 2007. – T. 179, № 10. – C. 6547-6554.
123. Chen B. J., Deoliveira D., Cui X., Le N. T., Son J., Whitesides J. F., Chao N. J. Inability of memory T cells to induce graft-versus-host disease is a result of an abortive alloresponse // *Blood*. – 2007. – T. 109, № 7. – C. 3115-3123.
124. Zheng H., Matte-Martone C., Li H., Anderson B. E., Venketesan S., Sheng Tan H., Jain D., McNiff J., Shlomchik W. D. Effector memory CD4⁺ T cells mediate graft-versus-leukemia without inducing graft-versus-host disease // *Blood*. – 2008. – T. 111, № 4. – C. 2476-2484.
125. Zheng H., Matte-Martone C., Jain D., McNiff J., Shlomchik W. D. Central memory CD8⁺ T cells induce graft-versus-host disease and mediate graft-versus-leukemia // *J. Immunol.* – 2009. – T. 182, № 10. – C. 5938-5948.
126. Li N., Matte-Martone C., Zheng H., Cui W., Venkatesan S., Tan H. S., McNiff J., Demetris A. J., Roopenian D., Kaeck S., Shlomchik W. D. Memory T cells from minor histocompatibility antigen-vaccinated and virus-immune donors improve GVL and immune reconstitution // *Blood*. – 2011. – T. 118, № 22. – C. 5965-5976.
127. Chan W. K., Suwannasaen D., Throm R. E., Li Y., Eldridge P. W., Houston J., Gray J. T., Pui C. H., Leung W. Chimeric antigen receptor-redirected CD45RA-negative T cells have potent antileukemia and pathogen memory response without graft-versus-host activity // *Leukemia*. – 2015. – T. 29, № 2. – C. 387-395.
128. Fernández L., Fernández A., Mirones I., Escudero A., Cardoso L., Vela M., Lanzarot D., de Paz R., Leivas A., Gallardo M., Marcos A., Romero A. B., Martínez-López J., Pérez-Martínez A. GMP-compliant manufacturing of NKG2D CAR memory T cells using CliniMACS Prodigy // *Front. Immunol.* – 2019. – T. 10. – C. 2361.
129. Kalos M., Levine B. L., Porter D. L., Katz S., Grupp S. A., Bagg A., June C. H. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia // *Sci Transl Med.* – 2011. – T. 3, № 95. – C. 95ra73.
130. Akpek G., Zahurak M. L., Piantadosi S., Margolis J., Doherty J., Davidson R., Vogelsang G. B. Development of a prognostic model for grading chronic graft-versus-host disease // *Blood*. – 2001. – T. 97, № 5. – C. 1219-26.
131. Brentjens R. J., Davila M. L., Riviere I., Park J., Wang X., Cowell L. G., Bartido S., Stefanski J., Taylor C., Olszewska M., Borquez-Ojeda O., Qu J., Wasielewska T., He Q., Bernal

- Y., Rijo I. V., Hedvat C., Kobos R., Curran K., Steinherz P., Jurcic J., Rosenblat T., Maslak P., Frattini M., Sadelain M. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia // *Sci Transl Med.* – 2013. – T. 5, № 177. – C. 177ra38.
132. Johnson L. A., June C. H. Driving gene-engineered T cell immunotherapy of cancer // *Cell Res.* – 2017. – T. 27, № 1. – C. 38-58.
133. Cappell K. M., Sherry R. M., Yang J. C., Goff S. L., Vanasse D. A., McIntyre L., Rosenberg S. A., Kochenderfer J. N. Long-Term Follow-Up of Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy // *J Clin Oncol.* – 2020. – T. 38, № 32. – C. 3805-3815.
134. Schuster S. J., Huw L. Y., Bolen C. R., Maximov V., Polson A. G., Hatzi K., Lasater E. A., Assouline S. E., Bartlett N. L., Budde L. E., Matasar M. J., Koeppen H., Piccione E. C., Wilson D., Wei M. C., Yin S., Penuel E. Loss of CD20 expression as a mechanism of resistance to mosunetuzumab in relapsed/refractory B-cell lymphomas // *Blood.* – 2024. – T. 143, № 9. – C. 822-832.
135. Reinert J., Beitzel-Heineke A., Wethmar K., Stelljes M., Fiedler W., Schwartz S. Loss of CD22 expression and expansion of a CD22(dim) subpopulation in adults with relapsed/refractory B-lymphoblastic leukaemia after treatment with Inotuzumab-Ozogamicin // *Ann Hematol.* – 2021. – T. 100, № 11. – C. 2727-2732.
136. Ramos C. A., Savoldo B., Torrano V., Ballard B., Zhang H., Dakhova O., Liu E., Carrum G., Kamble R. T., Gee A. P., Mei Z., Wu M. F., Liu H., Grilley B., Rooney C. M., Brenner M. K., Heslop H. E., Dotti G. Clinical responses with T lymphocytes targeting malignancy-associated kappa light chains // *J Clin Invest.* – 2016. – T. 126, № 7. – C. 2588-96.
137. Ranganathan R., Shou P., Ahn S., Sun C., West J., Savoldo B., Dotti G. CAR T cells Targeting Human Immunoglobulin Light Chains Eradicate Mature B-cell Malignancies While Sparing a Subset of Normal B Cells // *Clin Cancer Res.* – 2021. – T. 27, № 21. – C. 5951-5960.
138. Alcantara M., Tesio M., June C. H., Houot R. CAR T-cells for T-cell malignancies: challenges in distinguishing between therapeutic, normal, and neoplastic T-cells // *Leukemia.* – 2018. – T. 32, № 11. – C. 2307-2315.
139. Litzow M. R., Ferrando A. A. How I treat T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults // *Blood.* – 2015. – T. 126, № 7. – C. 833-41.
140. Hunger S. P., Mullighan C. G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children // *N Engl J Med.* – 2015. – T. 373, № 16. – C. 1541-52.
141. Marks D. I., Paietta E. M., Moorman A. V., Richards S. M., Buck G., DeWald G., Ferrando A., Fielding A. K., Goldstone A. H., Ketterling R. P., Litzow M. R., Luger S. M., McMillan A. K., Mansour M. R., Rowe J. M., Tallman M. S., Lazarus H. M. T-cell acute lymphoblastic

leukemia in adults: clinical features, immunophenotype, cytogenetics, and outcome from the large randomized prospective trial (UKALL XII/ECOG 2993) // *Blood*. – 2009. – T. 114, № 25. – C. 5136-45.

142. Gomes-Silva D., Srinivasan M., Sharma S., Lee C. M., Wagner D. L., Davis T. H., Rouse R. H., Bao G., Brenner M. K., Mamonkin M. CD7-edited T cells expressing a CD7-specific CAR for the therapy of T-cell malignancies // *Blood*. – 2017. – T. 130, № 3. – C. 285-296.

143. Mamonkin M., Rouse R. H., Tashiro H., Brenner M. K. A T-cell-directed chimeric antigen receptor for the selective treatment of T-cell malignancies // *Blood*. – 2015. – T. 126, № 8. – C. 983-92.

144. Watanabe N., Mo F., Zheng R., Ma R., Bray V. C., van Leeuwen D. G., Sritabal-Ramirez J., Hu H., Wang S., Mehta B., Srinivasan M., Scherer L. D., Zhang H., Thakkar S. G., Hill L. C., Heslop H. E., Cheng C., Brenner M. K., Mamonkin M. Feasibility and preclinical efficacy of CD7-unedited CD7 CAR T cells for T cell malignancies // *Mol Ther*. – 2023. – T. 31, № 1. – C. 24-34.

145. Pinz K., Liu H., Golightly M., Jares A., Lan F., Zieve G. W., Hagag N., Schuster M., Firor A. E., Jiang X., Ma Y. Preclinical targeting of human T-cell malignancies using CD4-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered T cells // *Leukemia*. – 2016. – T. 30, № 3. – C. 701-7.

146. Ramos C. A., Ballard B., Zhang H., Dakhova O., Gee A. P., Mei Z., Bilgi M., Wu M. F., Liu H., Grilley B., Bollard C. M., Chang B. H., Rooney C. M., Brenner M. K., Heslop H. E., Dotti G., Savoldo B. Clinical and immunological responses after CD30-specific chimeric antigen receptor-redirected lymphocytes // *J Clin Invest*. – 2017. – T. 127, № 9. – C. 3462-3471.

147. Wang C. M., Wu Z. Q., Wang Y., Guo Y. L., Dai H. R., Wang X. H., Li X., Zhang Y. J., Zhang W. Y., Chen M. X., Zhang Y., Feng K. C., Liu Y., Li S. X., Yang Q. M., Han W. D. Autologous T Cells Expressing CD30 Chimeric Antigen Receptors for Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma: An Open-Label Phase I Trial // *Clin Cancer Res*. – 2017. – T. 23, № 5. – C. 1156-1166.

148. Watanabe K., Gomez A. M., Kuramitsu S., Siurala M., Da T., Agarwal S., Song D., Scholler J., Rotolo A., Posey A. D., Rook A. H., Haun P. L., Ruella M., Young R. M., June C. H. Identifying highly active anti-CCR4 CAR T cells for the treatment of T-cell lymphoma // *Blood Adv*. – 2023. – T. 7, № 14. – C. 3416-3430.

149. Georgiadis C., Rasaiyaah J., Gkazi S. A., Preece R., Etuk A., Christi A., Qasim W. Base-edited CAR T cells for combinational therapy against T cell malignancies // *Leukemia*. – 2021. – T. 35, № 12. – C. 3466-3481.

150. Png Y. T., Vinanica N., Kamiya T., Shimasaki N., Coustan-Smith E., Campana D. Blockade of CD7 expression in T cells for effective chimeric antigen receptor targeting of T-cell malignancies // *Blood Adv.* – 2017. – T. 1, № 25. – C. 2348-2360.
151. Chen K. H., Wada M., Pinz K. G., Liu H., Lin K. W., Jares A., Firor A. E., Shuai X., Salman H., Golightly M., Lan F., Senzel L., Leung E. L., Jiang X., Ma Y. Preclinical targeting of aggressive T-cell malignancies using anti-CD5 chimeric antigen receptor // *Leukemia.* – 2017. – T. 31, № 10. – C. 2151-2160.
152. You F., Wang Y., Jiang L., Zhu X., Chen D., Yuan L., An G., Meng H., Yang L. A novel CD7 chimeric antigen receptor-modified NK-92MI cell line targeting T-cell acute lymphoblastic leukemia // *Am J Cancer Res.* – 2019. – T. 9, № 1. – C. 64-78.
153. Schumacher T. N., Schreiber R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy // *Science.* – 2015. – T. 348, № 6230. – C. 69-74.
154. Uhlen M., Fagerberg L., Hallstrom B. M., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson A., Kampf C., Sjostedt E., Asplund A., Olsson I., Edlund K., Lundberg E., Navani S., Szigartyo C. A., Odeberg J., Djureinovic D., Takanen J. O., Hober S., Alm T., Edqvist P. H., Berling H., Tegel H., Mulder J., Rockberg J., Nilsson P., Schwenk J. M., Hamsten M., von Feilitzen K., Forsberg M., Persson L., Johansson F., Zwahlen M., von Heijne G., Nielsen J., Ponten F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome // *Science.* – 2015. – T. 347, № 6220. – C. 1260419.
155. Uhlen M., Oksvold P., Fagerberg L., Lundberg E., Jonasson K., Forsberg M., Zwahlen M., Kampf C., Wester K., Hober S., Wernerus H., Bjorling L., Ponten F. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas // *Nat Biotechnol.* – 2010. – T. 28, № 12. – C. 1248-50.
156. Lamers C. H., Klaver Y., Gratama J. W., Sleijfer S., Debets R. Treatment of metastatic renal cell carcinoma (mRCC) with CAIX CAR-engineered T-cells-a completed study overview // *Biochem Soc Trans.* – 2016. – T. 44, № 3. – C. 951-9.
157. Morgan R. A., Yang J. C., Kitano M., Dudley M. E., Laurencot C. M., Rosenberg S. A. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2 // *Mol Ther.* – 2010. – T. 18, № 4. – C. 843-51.
158. Ellebrecht C. T., Bhoj V. G., Nace A., Choi E. J., Mao X., Cho M. J., Di Zenzo G., Lanzavecchia A., Seykora J. T., Cotsarelis G., Milone M. C., Payne A. S. Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease // *Science.* – 2016. – T. 353, № 6295. – C. 179-84.
159. Oh S., Mao X., Manfredo-Vieira S., Lee J., Patel D., Choi E. J., Alvarado A., Cottman-Thomas E., Maseda D., Tsao P. Y., Ellebrecht C. T., Khella S. L., Richman D. P., O'Connor K. C., Herzberg U., Binder G. K., Milone M. C., Basu S., Payne A. S. Precision targeting of

- autoantigen-specific B cells in muscle-specific tyrosine kinase myasthenia gravis with chimeric autoantibody receptor T cells // *Nat Biotechnol.* – 2023. – T. 41, № 9. – C. 1229-1238.
160. Reincke S. M., von Wardenburg N., Homeyer M. A., Kornau H. C., Spagni G., Li L. Y., Kreye J., Sanchez-Sendin E., Blumenau S., Stappert D., Radbruch H., Hauser A. E., Künkele A., Edes I., Schmitz D., Pruss H. Chimeric autoantibody receptor T cells deplete NMDA receptor-specific B cells // *Cell.* – 2023. – T. 186, № 23. – C. 5084-5097 e18.
161. Seifert L., Riecken K., Zahner G., Hambach J., Hagenstein J., Dubberke G., Huber T. B., Koch-Nolte F., Fehse B., Tomas N. M. An antigen-specific chimeric autoantibody receptor (CAAR) NK cell strategy for the elimination of anti-PLA2R1 and anti-THSD7A antibody-secreting cells // *Kidney Int.* – 2024. – T. 105, № 4. – C. 886-889.
162. Sahlolbei M., Azangou-Khyavy M., Khanali J., Khorsand B., Shiralipour A., Ahmadbeigi N., Madjd Z., Ghanbarian H., Ardjmand A., Hashemi S. M., Kiani J. Engineering chimeric autoantibody receptor T cells for targeted B cell depletion in multiple sclerosis model: An in-vitro study // *Heliyon.* – 2023. – T. 9, № 9. – C. e19763.
163. Chen N., Xu Y., Mou J., Rao Q., Xing H., Tian Z., Tang K., Wang M., Wang J. Targeting of IL-10R on acute myeloid leukemia blasts with chimeric antigen receptor-expressing T cells // *Blood Cancer J.* – 2021. – T. 11, № 8. – C. 144.
164. Huang G., Yu L., Cooper L. J., Hollomon M., Huls H., Kleinerman E. S. Genetically modified T cells targeting interleukin-11 receptor alpha-chain kill human osteosarcoma cells and induce the regression of established osteosarcoma lung metastases // *Cancer Res.* – 2012. – T. 72, № 1. – C. 271-81.
165. Ramirez-Chacon A., Betriu-Mendez S., Bartolo-Ibars A., Gonzalez A., Marti M., Juan M. Ligand-based CAR-T cell: Different strategies to drive T cells in future new treatments // *Front Immunol.* – 2022. – T. 13. – C. 932559.
166. Hasegawa A., Saito S., Narimatsu S., Nakano S., Nagai M., Ohnota H., Inada Y., Morokawa H., Nakashima I., Morita D., Ide Y., Matsuda K., Tashiro H., Yagyu S., Tanaka M., Nakazawa Y. Mutated GM-CSF-based CAR-T cells targeting CD116/CD131 complexes exhibit enhanced anti-tumor effects against acute myeloid leukaemia // *Clin Transl Immunology.* – 2021. – T. 10, № 5. – C. e1282.
167. Zoine J. T., Prince C., Story J. Y., Branella G. M., Lytle A. M., Fedanov A., Alexander J. S., Porter C. C., Doering C. B., Spencer H. T., Chandrakasan S. Thrombopoietin-based CAR-T cells demonstrate in vitro and in vivo cytotoxicity to MPL positive acute myelogenous leukemia and hematopoietic stem cells // *Gene Ther.* – 2022. – T. 29, № 5. – C. 1-12.

168. Han X., Cinay G. E., Zhao Y., Guo Y., Zhang X., Wang P. Adnectin-Based Design of Chimeric Antigen Receptor for T Cell Engineering // *Mol Ther.* – 2017. – T. 25, № 11. – C. 2466-2476.
169. Sauer T., Parikh K., Sharma S., Omer B., Sedloev D., Chen Q., Angenendt L., Schliemann C., Schmitt M., Muller-Tidow C., Gottschalk S., Rooney C. M. CD70-specific CAR T cells have potent activity against acute myeloid leukemia without HSC toxicity // *Blood.* – 2021. – T. 138, № 4. – C. 318-330.
170. Schmidts A., Ormhoj M., Choi B. D., Taylor A. O., Bouffard A. A., Scarfo I., Larson R. C., Frigault M. J., Gallagher K., Castano A. P., Riley L. S., Cabral M. L., Boroughs A. C., Velasco Cardenas R. M., Schamel W., Zhou J., Mackay S., Tai Y. T., Anderson K. C., Maus M. V. Rational design of a trimeric APRIL-based CAR-binding domain enables efficient targeting of multiple myeloma // *Blood Adv.* – 2019. – T. 3, № 21. – C. 3248-3260.
171. Wang Y., Xu Y., Li S., Liu J., Xing Y., Xing H., Tian Z., Tang K., Rao Q., Wang M., Wang J. Targeting FLT3 in acute myeloid leukemia using ligand-based chimeric antigen receptor-engineered T cells // *J Hematol Oncol.* – 2018. – T. 11, № 1. – C. 60.
172. Brown C. E., Alizadeh D., Starr R., Weng L., Wagner J. R., Naranjo A., Ostberg J. R., Blanchard M. S., Kilpatrick J., Simpson J., Kurien A., Priceman S. J., Wang X., Harshbarger T. L., D'Apuzzo M., Ressler J. A., Jensen M. C., Barish M. E., Chen M., Portnow J., Forman S. J., Badie B. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy // *N Engl J Med.* – 2016. – T. 375, № 26. – C. 2561-9.
173. Nagler A., Labopin M., Houhou M., Aljurf M., Mousavi A., Hamladji R. M., Al Zahrani M., Bondarenko S., Arat M., Angelucci E., Koc Y., Gulbas Z., Sica S., Bourhis J. H., Canaani J., Brissot E., Giebel S., Mohty M. Outcome of haploidentical versus matched sibling donors in hematopoietic stem cell transplantation for adult patients with acute lymphoblastic leukemia: a study from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation // *J Hematol Oncol.* – 2021. – T. 14, № 1. – C. 53.
174. Spyridonidis A., Labopin M., Schmid C., Volin L., Yakoub-Agha I., Stadler M., Milpied N., Socie G., Browne P., Lenhoff S., Sanz M. A., Aljurf M., Mohty M., Rocha V., Immunotherapy Subcommittee of Acute Leukemia Working P. Outcomes and prognostic factors of adults with acute lymphoblastic leukemia who relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation. An analysis on behalf of the Acute Leukemia Working Party of EBMT // *Leukemia.* – 2012. – T. 26, № 6. – C. 1211-7.
175. Collins R. H., Jr., Goldstein S., Giralt S., Levine J., Porter D., Drobyski W., Barrett J., Johnson M., Kirk A., Horowitz M., Parker P. Donor leukocyte infusions in acute lymphocytic leukemia // *Bone Marrow Transplant.* – 2000. – T. 26, № 5. – C. 511-6.

176. 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 A. V., Gabibov A. G., An Y., Sun R., Zhang Y., Maschan M. A., 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. – T. 38, № 6. – C. 1419-1422.
177. Graham C., Jozwik A., Pepper A., Benjamin R. Allogeneic CAR-T Cells: More than Ease of Access? // *Cells*. – 2018. – T. 7, № 10.
178. Zhang X., Lu X. A., Yang J., Zhang G., Li J., Song L., Su Y., Shi Y., Zhang M., He J., Song D., Lv F., Li W., Wu Y., Wang H., Liu H., Zhou X., He T., Lu P. Efficacy and safety of anti-CD19 CAR T-cell therapy in 110 patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia with high-risk features // *Blood Adv.* – 2020. – T. 4, № 10. – C. 2325-2338.
179. Chen Y. H., Zhang X., Cheng Y. F., Chen H., Mo X. D., Yan C. H., Chen Y., Han W., Sun Y. Q., Wang Y., Zhang X. H., Xu L. P., Liu K. Y., Yang J., Zhang J., Zhang G. L., Shi Y., Su Y. C., Li W. Q., Xu L., Song D., Zhang M., Lu P., Huang X. J. Long-term follow-up of CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation // *Cytotherapy*. – 2020. – T. 22, № 12. – C. 755-761.
180. Gardner R. A., Finney O., Annesley C., Brakke H., Summers C., Leger K., Bleakley M., Brown C., Mgebroff S., Kelly-Spratt K. S., Hoglund V., Lindgren C., Oron A. P., Li D., Riddell S. R., Park J. R., Jensen M. C. Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults // *Blood*. – 2017. – T. 129, № 25. – C. 3322-3331.
181. Ding L., Wang Y., Hong R., Zhao H., Zhou L., Wei G., Wu W., Xu H., Zhang Y., Luo Y., Shi J., Chang A. H., Hu Y., Huang H. Efficacy and Safety of Chimeric Antigen Receptor T Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia With Post-Transplant Relapse // *Front Oncol.* – 2021. – T. 11. – C. 750218.
182. Arai Y., Choi U., Corsino C. I., Koontz S. M., Tajima M., Sweeney C. L., Black M. A., Feldman S. A., Dinauer M. C., Malech H. L. Myeloid conditioning with c-kit-targeted CAR-T cells enables donor stem cell engraftment // *Mol. Ther.* – 2018. – T. 26, № 5. – C. 1181-1197.
183. Myburgh R., Kiefer J. D., Russkamp N. F., Magnani C. F., Nuñez N., Simonis A., Pfister S., Wilk C. M., McHugh D., Friemel J., Müller A. M., Becher B., Münz C., van den Broek M., Neri D., Manz M. G. Anti-human CD117 CAR T-cells efficiently eliminate healthy and malignant CD117-expressing hematopoietic cells // *Leukemia*. – 2020. – T. 34, № 10. – C. 2688-2703.

184. Sugita M., Galetto R., Zong H., Ewing-Crystal N., Trujillo-Alonso V., Mencia-Trinchant N., Yip W., Filipe S., Lebuhotel C., Gouble A., Hassane D. C., Smith J., Roboz G. J., Guzman M. L. Allogeneic TCR $\alpha\beta$ deficient CAR T-cells targeting CD123 in acute myeloid leukemia // *Nat. Commun.* – 2022. – T. 13, № 1. – C. 2227.
185. El Khawanky N., Hughes A., Yu W., Myburgh R., Matschulla T., Taromi S., Aumann K., Clarson J., Vinnakota J. M., Shoumariyeh K., Miething C., Lopez A. F., Brown M. P., Duyster J., Hein L., Manz M. G., Hughes T. P., White D. L., Yong A. S. M., Zeiser R. Demethylating therapy increases anti-CD123 CAR T cell cytotoxicity against acute myeloid leukemia // *Nat. Commun.* – 2021. – T. 12, № 1. – C. 6436.
186. Hermiston M. L., Xu Z., Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells // *Annu. Rev. Immunol.* – 2003. – T. 21, № 1. – C. 107-137.
187. Dahlke M. H., Larsen S. R., Rasko J. E. J., Schlitt H. J. The biology of CD45 and its use as a therapeutic target // *Leuk. Lymphoma.* – 2004. – T. 45, № 2. – C. 229-236.
188. Matthews D. C., Martin P. J., Nourigat C., Appelbaum F. R., Fisher D. R., Bernstein I. D. Marrow ablative and immunosuppressive effects of 131I-anti-CD45 antibody in congenic and H2-mismatched murine transplant models // *Blood.* – 1999. – T. 93, № 2. – C. 737-45.
189. Ruffner K. L., Martin P. J., Hussell S., Nourigat C., Fisher D. R., Bernstein I. D., Matthews D. C. Immunosuppressive effects of (131)I-anti-CD45 antibody in unsensitized and donor antigen-presensitized H2-matched, minor antigen-mismatched murine transplant models // *Cancer Res.* – 2001. – T. 61, № 13. – C. 5126-31.
190. Orozco J. J., Kenoyer A., Balkin E. R., Gooley T. A., Hamlin D. K., Wilbur D. S., Hylarides M. D., Frost S. H., Mawad R., O'Donnell P., Sandmaier B. M., Fuchs E. J., Luznik L., Green D. J., Gopal A. K., Press O. W., Pagel J. M. Anti-CD45 radioimmunotherapy without TBI before transplantation facilitates persistent haploidentical donor engraftment // *Blood.* – 2016. – T. 127, № 3. – C. 352-9.
191. Castiello M. C., Bosticardo M., Sacchetti N., Calzoni E., Fontana E., Yamazaki Y., Draghici E., Corsino C., Bortolomai I., Sereni L., Yu H. H., Uva P., Palchaudhuri R., Scadden D. T., Villa A., Notarangelo L. D. Efficacy and safety of anti-CD45-saporin as conditioning agent for RAG deficiency // *J Allergy Clin Immunol.* – 2021. – T. 147, № 1. – C. 309-320 e6.
192. Saha A., Hyzy S., Lamothe T., Hammond K., Clark N., Lanieri L., Bhattarai P., Palchaudhuri R., Gillard G. O., Proctor J., Riddle M. J., Panoskaltsis-Mortari A., MacMillan M. L., Wagner J. E., Kiem H. P., Olson L. M., Blazar B. R. A CD45-targeted antibody-drug conjugate successfully conditions for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in mice // *Blood.* – 2022. – T. 139, № 11. – C. 1743-1759.

193. Wulf G. G., Luo K. L., Goodell M. A., Brenner M. K. Anti-CD45-mediated cyto reduction to facilitate allogeneic stem cell transplantation // *Blood*. – 2003. – T. 101, № 6. – C. 2434-9.
194. Brenner M. K., Wulf G. G., Rill D. R., Luo K. L., Goodell M. A., Mei Z., Kuehnle I., Brown M. P., Pule M., Heslop H. E., Krance R. A. Complement-fixing CD45 monoclonal antibodies to facilitate stem cell transplantation in mouse and man // *Ann N Y Acad Sci*. – 2003. – T. 996. – C. 80-8.
195. Pagel J. M., Matthews D. C., Appelbaum F. R., Bernstein I. D., Press O. W. The use of radioimmunoconjugates in stem cell transplantation // *Bone Marrow Transplant*. – 2002. – T. 29, № 10. – C. 807-16.
196. Burtner C. R., Chandrasekaran D., Santos E. B., Beard B. C., Adair J. E., Hamlin D. K., Wilbur D. S., Sandmaier B. M., Kiem H. P. (211)Astatine-Conjugated Monoclonal CD45 Antibody-Based Nonmyeloablative Conditioning for Stem Cell Gene Therapy // *Hum Gene Ther*. – 2015. – T. 26, № 6. – C. 399-406.
197. Dai Z., Mu W., Zhao Y., Jia X., Liu J., Wei Q., Tan T., Zhou J. The rational development of CD5-targeting biepitopic CARs with fully human heavy-chain-only antigen recognition domains // *Mol Ther*. – 2021. – T. 29, № 9. – C. 2707-2722.
198. Dai Z., Mu W., Zhao Y., Cheng J., Lin H., Ouyang K., Jia X., Liu J., Wei Q., Wang M., Liu C., Tan T., Zhou J. T cells expressing CD5/CD7 bispecific chimeric antigen receptors with fully human heavy-chain-only domains mitigate tumor antigen escape // *Signal Transduct Target Ther*. – 2022. – T. 7, № 1. – C. 85.
199. Freiwan A., Zoine J. T., Crawford J. C., Vaidya A., Schattgen S. A., Myers J. A., Patil S. L., Khanlari M., Inaba H., Klco J. M., Mullighan C. G., Krenciute G., Chockley P. J., Naik S., Langfitt D. M., Mamonkin M., Obeng E. A., Thomas P. G., Gottschalk S., Velasquez M. P. Engineering naturally occurring CD7- T cells for the immunotherapy of hematological malignancies // *Blood*. – 2022. – T. 140, № 25. – C. 2684-2696.
200. Velasquez M. P., Mamonkin M. CD7 CAR: sword and shield // *Blood*. – 2022. – T. 140, № 4. – C. 293-294.
201. Gomes-Silva D., Atilla E., Atilla P. A., Mo F., Tashiro H., Srinivasan M., Lulla P., Rouse R. H., Cabral J. M. S., Ramos C. A., Brenner M. K., Mamonkin M. CD7 CAR T Cells for the Therapy of Acute Myeloid Leukemia // *Mol Ther*. – 2019. – T. 27, № 1. – C. 272-280.
202. Glisovic-Aplenc T., Diorio C., Chukinas J. A., Veliz K., Shestova O., Shen F., Nunez-Cruz S., Vincent T. L., Miao F., Milone M. C., June C. H., Teachey D. T., Tasian S. K., Aplenc R., Gill S. CD38 as a pan-hematologic target for chimeric antigen receptor T cells // *Blood Adv*. – 2023. – T. 7, № 16. – C. 4418-4430.

203. Gao Z., Tong C., Wang Y., Chen D., Wu Z., Han W. Blocking CD38-driven fratricide among T cells enables effective antitumor activity by CD38-specific chimeric antigen receptor T cells // *J Genet Genomics*. – 2019. – T. 46, № 8. – C. 367-377.
204. Xiao Q., Zhang X., Tu L., Cao J., Hinrichs C. S., Su X. Size-dependent activation of CAR-T cells // *Sci. Immunol.* – 2022. – T. 7, № 74. – C. eabl3995.
205. Davenport A. J., Cross R. S., Watson K. A., Liao Y., Shi W., Prince H. M., Beavis P. A., Trapani J. A., Kershaw M. H., Ritchie D. S., Darcy P. K., Neeson P. J., Jenkins M. R. Chimeric antigen receptor T cells form nonclassical and potent immune synapses driving rapid cytotoxicity // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2018. – T. 115, № 9. – C. E2068-E2076.
206. Wachsmann T. L. A., Wouters A. K., Remst D. F. G., Hagedoorn R. S., Meeuwssen M. H., van Diest E., Leusen J., Kuball J., Falkenburg J. H. F., Heemskerk M. H. M. Comparing CAR and TCR engineered T cell performance as a function of tumor cell exposure // *Oncoimmunology*. – 2022. – T. 11, № 1. – C. 2033528.
207. Brudno J. N., Kochenderfer J. N. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management // *Blood*. – 2016. – T. 127, № 26. – C. 3321-30.
208. Frey N., Porter D. Cytokine Release Syndrome with Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy // *Biol Blood Marrow Transplant*. – 2019. – T. 25, № 4. – C. e123-e127.
209. Mirzaee Godarzee M., Mahmud Hussien B., Razmara E., Hakak-Zargar B., Mohajerani F., Dabiri H., Fatih Rasul M., Ghazimoradi M. H., Babashah S., Sadeghizadeh M. Strategies to overcome the side effects of chimeric antigen receptor T cell therapy // *Ann N Y Acad Sci*. – 2022. – T. 1510, № 1. – C. 18-35.
210. Lee D. W., Gardner R., Porter D. L., Louis C. U., Ahmed N., Jensen M., Grupp S. A., Mackall C. L. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome // *Blood*. – 2014. – T. 124, № 2. – C. 188-95.
211. Shimabukuro-Vornhagen A., Godel P., Subklewe M., Stemmler H. J., Schlosser H. A., Schlaak M., Kochanek M., Boll B., von Bergwelt-Baildon M. S. Cytokine release syndrome // *J Immunother Cancer*. – 2018. – T. 6, № 1. – C. 56.
212. Santomasso B. D., Park J. H., Salloum D., Riviere I., Flynn J., Mead E., Halton E., Wang X., Senechal B., Purdon T., Cross J. R., Liu H., Vachha B., Chen X., DeAngelis L. M., Li D., Bernal Y., Gonen M., Wendel H. G., Sadelain M., Brentjens R. J. Clinical and Biological Correlates of Neurotoxicity Associated with CAR T-cell Therapy in Patients with B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia // *Cancer Discov*. – 2018. – T. 8, № 8. – C. 958-971.
213. Wu C. Y., Roybal K. T., Puchner E. M., Onuffer J., Lim W. A. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor // *Science*. – 2015. – T. 350, № 6258. – C. aab4077.

214. Leung W. H., Gay J., Martin U., Garrett T. E., Horton H. M., Certo M. T., Blazar B. R., Morgan R. A., Gregory P. D., Jarjour J., Astrakhan A. Sensitive and adaptable pharmacological control of CAR T cells through extracellular receptor dimerization // *JCI Insight*. – 2019. – T. 5, № 11.
215. Ge C., Ma C., Cui J., Dong X., Sun L., Li Y., Yu A. Rapamycin suppresses inflammation and increases the interaction between p65 and IkappaBalpha in rapamycin-induced fatty livers // *PLoS One*. – 2023. – T. 18, № 3. – C. e0281888.
216. Hadamitzky M., Herring A., Kirchhof J., Bendix I., Haight M. J., Keyvani K., Luckemann L., Unteroberdorster M., Schedlowski M. Repeated Systemic Treatment with Rapamycin Affects Behavior and Amygdala Protein Expression in Rats // *Int J Neuropsychopharmacol*. – 2018. – T. 21, № 6. – C. 592-602.
217. Thomson A. W., Turnquist H. R., Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition // *Nat Rev Immunol*. – 2009. – T. 9, № 5. – C. 324-37.
218. Zhou Q., Doherty J., Akk A., Springer L. E., Fan P., Spasojevic I., Halade G. V., Yang H., Pham C. T. N., Wickline S. A., Pan H. Safety Profile of Rapamycin Perfluorocarbon Nanoparticles for Preventing Cisplatin-Induced Kidney Injury // *Nanomaterials (Basel)*. – 2022. – T. 12, № 3.
219. Zajc C. U., Dobersberger M., Schaffner I., Mlynek G., Puhlinger D., Salzer B., Djinoivic-Carugo K., Steinberger P., De Sousa Linhares A., Yang N. J., Obinger C., Holter W., Traxlmayr M. W., Lehner M. A conformation-specific ON-switch for controlling CAR T cells with an orally available drug // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2020. – T. 117, № 26. – C. 14926-14935.
220. Tamada K., Geng D., Sakoda Y., Bansal N., Srivastava R., Li Z., Davila E. Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies // *Clin Cancer Res*. – 2012. – T. 18, № 23. – C. 6436-45.
221. Urbanska K., Lanitis E., Poussin M., Lynn R. C., Gavin B. P., Kelderman S., Yu J., Scholler N., Powell D. J., Jr. A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor // *Cancer Res*. – 2012. – T. 72, № 7. – C. 1844-52.
222. Rodgers D. T., Mazagova M., Hampton E. N., Cao Y., Ramadoss N. S., Hardy I. R., Schulman A., Du J., Wang F., Singer O., Ma J., Nunez V., Shen J., Woods A. K., Wright T. M., Schultz P. G., Kim C. H., Young T. S. Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2016. – T. 113, № 4. – C. E459-68.
223. Di Stasi A., Tey S. K., Dotti G., Fujita Y., Kennedy-Nasser A., Martinez C., Straathof K., Liu E., Durett A. G., Grilley B., Liu H., Cruz C. R., Savoldo B., Gee A. P., Schindler J., Krance R. A., Heslop H. E., Spencer D. M., Rooney C. M., Brenner M. K. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy // *N Engl J Med*. – 2011. – T. 365, № 18. – C. 1673-83.

224. Zhou X., Naik S., Dakhova O., Dotti G., Heslop H. E., Brenner M. K. Serial Activation of the Inducible Caspase 9 Safety Switch After Human Stem Cell Transplantation // *Mol Ther.* – 2016. – T. 24, № 4. – C. 823-31.
225. Moolten F. L. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy // *Cancer Res.* – 1986. – T. 46, № 10. – C. 5276-81.
226. Tiberghien P., Reynolds C. W., Keller J., Spence S., Deschaseaux M., Certoux J. M., Contassot E., Murphy W. J., Lyons R., Chiang Y., et al. Ganciclovir treatment of herpes simplex thymidine kinase-transduced primary T lymphocytes: an approach for specific in vivo donor T-cell depletion after bone marrow transplantation? // *Blood.* – 1994. – T. 84, № 4. – C. 1333-41.
227. Bonini C., Bordignon C. Potential and limitations of HSV-TK-transduced donor peripheral blood lymphocytes after allo-BMT // *Hematol Cell Ther.* – 1997. – T. 39, № 5. – C. 273-4.
228. Oliveira G., Greco R., Lupo-Stanghellini M. T., Vago L., Bonini C. Use of TK-cells in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation // *Curr Opin Hematol.* – 2012. – T. 19, № 6. – C. 427-33.
229. Greco R., Oliveira G., Stanghellini M. T., Vago L., Bondanza A., Peccatori J., Cieri N., Marktel S., Mastaglio S., Bordignon C., Bonini C., Ciceri F. Improving the safety of cell therapy with the TK-suicide gene // *Front Pharmacol.* – 2015. – T. 6. – C. 95.
230. Riddell S. R., Elliott M., Lewinsohn D. A., Gilbert M. J., Wilson L., Manley S. A., Lupton S. D., Overell R. W., Reynolds T. C., Corey L., Greenberg P. D. T-cell mediated rejection of gene-modified HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients // *Nat Med.* – 1996. – T. 2, № 2. – C. 216-23.
231. Maury S., Rosenzwajg M., Redjoul R., Marcais A., Xhaard A., Cherai M., Cabanne L., Churlaud G., Suarez F., Socie G., Gregoire L., Debbache K., Bernard C., Beaumont J. L., Azar N., Boyer O., Roudot-Thoraval F., Cohen J. L., Cordonnier C., Lemoine F. M., Klatzmann D. Lymphodepletion followed by infusion of suicide gene-transduced donor lymphocytes to safely enhance their antitumor effect: a phase I/II study // *Leukemia.* – 2014. – T. 28, № 12. – C. 2406-10.
232. Kieback E., Charo J., Sommermeyer D., Blankenstein T., Uckert W. A safeguard eliminates T cell receptor gene-modified autoreactive T cells after adoptive transfer // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – T. 105, № 2. – C. 623-8.
233. Philip B., Kokalaki E., Mekkaoui L., Thomas S., Straathof K., Flutter B., Marin V., Marafioti T., Chakraverty R., Linch D., Quezada S. A., Peggs K. S., Pule M. A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy // *Blood.* – 2014. – T. 124, № 8. – C. 1277-87.

234. Introna M., Barbui A. M., Bambacioni F., Casati C., Gaipa G., Borleri G., Bernasconi S., Barbui T., Golay J., Biondi A., Rambaldi A. Genetic modification of human T cells with CD20: a strategy to purify and lyse transduced cells with anti-CD20 antibodies // *Hum Gene Ther.* – 2000. – T. 11, № 4. – C. 611-20.
235. Griffioen M., van Egmond E. H., Kester M. G., Willemze R., Falkenburg J. H., Heemskerk M. H. Retroviral transfer of human CD20 as a suicide gene for adoptive T-cell therapy // *Haematologica.* – 2009. – T. 94, № 9. – C. 1316-20.
236. Wang X., Chang W. C., Wong C. W., Colcher D., Sherman M., Ostberg J. R., Forman S. J., Riddell S. R., Jensen M. C. A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells // *Blood.* – 2011. – T. 118, № 5. – C. 1255-63.
237. Fedorov V. D., Themeli M., Sadelain M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses // *Sci Transl Med.* – 2013. – T. 5, № 215. – C. 215ra172.
238. Grada Z., Hegde M., Byrd T., Shaffer D. R., Ghazi A., Brawley V. S., Corder A., Schonfeld K., Koch J., Dotti G., Heslop H. E., Gottschalk S., Wels W. S., Baker M. L., Ahmed N. TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy // *Mol Ther Nucleic Acids.* – 2013. – T. 2, № 7. – C. e105.
239. Kloss C. C., Condomines M., Cartellieri M., Bachmann M., Sadelain M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells // *Nat Biotechnol.* – 2013. – T. 31, № 1. – C. 71-5.
240. Morsut L., Roybal K. T., Xiong X., Gordley R. M., Coyle S. M., Thomson M., Lim W. A. Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors // *Cell.* – 2016. – T. 164, № 4. – C. 780-91.
241. Harrer D. C., Simon B., Fujii S. I., Shimizu K., Uslu U., Schuler G., Gerer K. F., Hoyer S., Dorrie J., Schaft N. RNA-transfection of gamma/delta T cells with a chimeric antigen receptor or an alpha/beta T-cell receptor: a safer alternative to genetically engineered alpha/beta T cells for the immunotherapy of melanoma // *BMC Cancer.* – 2017. – T. 17, № 1. – C. 551.
242. Beatty G. L., Haas A. R., Maus M. V., Torigian D. A., Soulen M. C., Plesa G., Chew A., Zhao Y., Levine B. L., Albelda S. M., Kalos M., June C. H. Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T cells induce anti-tumor activity in solid malignancies // *Cancer Immunol Res.* – 2014. – T. 2, № 2. – C. 112-20.
243. Birkholz K., Hombach A., Krug C., Reuter S., Kershaw M., Kampgen E., Schuler G., Abken H., Schaft N., Dorrie J. Transfer of mRNA encoding recombinant immunoreceptors reprograms CD4⁺ and CD8⁺ T cells for use in the adoptive immunotherapy of cancer // *Gene Ther.* – 2009. – T. 16, № 5. – C. 596-604.

244. Rurik J. G., Tombacz I., Yadegari A., Mendez Fernandez P. O., Shewale S. V., Li L., Kimura T., Soliman O. Y., Papp T. E., Tam Y. K., Mui B. L., Albelda S. M., Pure E., June C. H., Aghajanian H., Weissman D., Parhiz H., Epstein J. A. CAR T cells produced in vivo to treat cardiac injury // *Science*. – 2022. – T. 375, № 6576. – C. 91-96.
245. Lohmueller J. J., Ham J. D., Kvorjak M., Finn O. J. mSA2 affinity-enhanced biotin-binding CAR T cells for universal tumor targeting // *Oncoimmunology*. – 2017. – T. 7, № 1. – C. e1368604.
246. Ma J. S., Kim J. Y., Kazane S. A., Choi S. H., Yun H. Y., Kim M. S., Rodgers D. T., Pugh H. M., Singer O., Sun S. B., Fonslow B. R., Kochenderfer J. N., Wright T. M., Schultz P. G., Young T. S., Kim C. H., Cao Y. Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2016. – T. 113, № 4. – C. E450-8.
247. Cho J. H., Collins J. J., Wong W. W. Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses // *Cell*. – 2018. – T. 173, № 6. – C. 1426-1438 e11.
248. D'Aloia M. M., Caratelli S., Palumbo C., Battella S., Arriga R., Lauro D., Palmieri G., Sconocchia G., Alimandi M. T lymphocytes engineered to express a CD16-chimeric antigen receptor redirect T-cell immune responses against immunoglobulin G-opsonized target cells // *Cytotherapy*. – 2016. – T. 18, № 2. – C. 278-90.
249. Raj D., Yang M. H., Rodgers D., Hampton E. N., Begum J., Mustafa A., Lorzio D., Garces I., Propper D., Kench J. G., Kocher H. M., Young T. S., Aicher A., Heeschen C. Switchable CAR-T cells mediate remission in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma // *Gut*. – 2019. – T. 68, № 6. – C. 1052-1064.
250. Landgraf K. E., Williams S. R., Steiger D., Gebhart D., Lok S., Martin D. W., Roybal K. T., Kim K. C. convertibleCARs: A chimeric antigen receptor system for flexible control of activity and antigen targeting // *Commun Biol*. – 2020. – T. 3, № 1. – C. 296.
251. Clemenceau B., Congy-Jolivet N., Gallot G., Vivien R., Gaschet J., Thibault G., Vie H. Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is mediated by genetically modified antigen-specific human T lymphocytes // *Blood*. – 2006. – T. 107, № 12. – C. 4669-77.
252. Kudo K., Imai C., Lorenzini P., Kamiya T., Kono K., Davidoff A. M., Chng W. J., Campana D. T lymphocytes expressing a CD16 signaling receptor exert antibody-dependent cancer cell killing // *Cancer Res*. – 2014. – T. 74, № 1. – C. 93-103.
253. Pennell C. A., Campbell H., Storlie M. D., Bolivar-Wagers S., Osborn M. J., Refaeli Y., Jensen M., Viaud S., Young T. S., Blazar B. R. Human CD19-specific switchable CAR T-cells are efficacious as constitutively active CAR T-cells but cause less morbidity in a mouse model of human CD19(+) malignancy // *J Immunother Cancer*. – 2022. – T. 10, № 12.

254. Wermke M., Kraus S., Ehninger A., Bargou R. C., Goebeler M. E., Middeke J. M., Kreissig C., von Bonin M., Koedam J., Pehl M., Bornhauser M., Einsele H., Ehninger G., Cartellieri M. Proof of concept for a rapidly switchable universal CAR-T platform with UniCAR-T-CD123 in relapsed/refractory AML // *Blood*. – 2021. – T. 137, № 22. – C. 3145-3148.
255. Sutherland A. R., Owens M. N., Geyer C. R. Modular Chimeric Antigen Receptor Systems for Universal CAR T Cell Retargeting // *Int J Mol Sci*. – 2020. – T. 21, № 19.
256. Chinol M., Casalini P., Maggiolo M., Canevari S., Omodeo E. S., Caliceti P., Veronese F. M., Cremonesi M., Chiolerio F., Nardone E., Siccardi A. G., Paganelli G. Biochemical modifications of avidin improve pharmacokinetics and biodistribution, and reduce immunogenicity // *Br J Cancer*. – 1998. – T. 78, № 2. – C. 189-97.
257. Cao Y., Rodgers D. T., Du J., Ahmad I., Hampton E. N., Ma J. S., Mazagova M., Choi S. H., Yun H. Y., Xiao H., Yang P., Luo X., Lim R. K., Pugh H. M., Wang F., Kazane S. A., Wright T. M., Kim C. H., Schultz P. G., Young T. S. Design of Switchable Chimeric Antigen Receptor T Cells Targeting Breast Cancer // *Angew Chem Int Ed Engl*. – 2016. – T. 55, № 26. – C. 7520-4.
258. Zhang E., Gu J., Xue J., Lin C., Liu C., Li M., Hao J., Setrerrahmane S., Chi X., Qi W., Hu J., Xu H. Accurate control of dual-receptor-engineered T cell activity through a bifunctional anti-angiogenic peptide // *J Hematol Oncol*. – 2018. – T. 11, № 1. – C. 44.
259. Chu W., Zhou Y., Tang Q., Wang M., Ji Y., Yan J., Yin D., Zhang S., Lu H., Shen J. Bi-specific ligand-controlled chimeric antigen receptor T-cell therapy for non-small cell lung cancer // *Biosci Trends*. – 2018. – T. 12, № 3. – C. 298-308.
260. Lu Y. J., Chu H., Wheeler L. W., Nelson M., Westrick E., Matthaei J. F., Cardle, II, Johnson A., Gustafson J., Parker N., Vetzal M., Xu L. C., Wang E. Z., Jensen M. C., Klein P. J., Low P. S., Leamon C. P. Preclinical Evaluation of Bispecific Adaptor Molecule Controlled Folate Receptor CAR-T Cell Therapy With Special Focus on Pediatric Malignancies // *Front Oncol*. – 2019. – T. 9. – C. 151.
261. Kim M. S., Ma J. S., Yun H., Cao Y., Kim J. Y., Chi V., Wang D., Woods A., Sherwood L., Caballero D., Gonzalez J., Schultz P. G., Young T. S., Kim C. H. Redirection of genetically engineered CAR-T cells using bifunctional small molecules // *J Am Chem Soc*. – 2015. – T. 137, № 8. – C. 2832-5.
262. Zakeri B., Fierer J. O., Celik E., Chittock E. C., Schwarz-Linek U., Moy V. T., Howarth M. Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2012. – T. 109, № 12. – C. E690-7.
263. Minutolo N. G., Sharma P., Poussin M., Shaw L. C., Brown D. P., Hollander E. E., Smole A., Rodriguez-Garcia A., Hui J. Z., Zappala F., Tsourkas A., Powell D. J., Jr. Quantitative

Control of Gene-Engineered T-Cell Activity through the Covalent Attachment of Targeting Ligands to a Universal Immune Receptor // *J Am Chem Soc.* – 2020. – T. 142, № 14. – C. 6554-6568.

264. Liu X., Wen J., Yi H., Hou X., Yin Y., Ye G., Wu X., Jiang X. Split chimeric antigen receptor-modified T cells targeting glypican-3 suppress hepatocellular carcinoma growth with reduced cytokine release // *Ther Adv Med Oncol.* – 2020. – T. 12. – C. 1758835920910347.

265. Herzig E., Kim K. C., Packard T. A., Vardi N., Schwarzer R., Gramatica A., Deeks S. G., Williams S. R., Landgraf K., Killeen N., Martin D. W., Weinberger L. S., Greene W. C. Attacking Latent HIV with convertible CAR-T Cells, a Highly Adaptable Killing Platform // *Cell.* – 2019. – T. 179, № 4. – C. 880-894 e10.

266. Ruffo E., Butchy A. A., Tivon Y., So V., Kvorjak M., Parikh A., Adams E. L., Miskov-Zivanov N., Finn O. J., Deiters A., Lohmueller J. Post-translational covalent assembly of CAR and synNotch receptors for programmable antigen targeting // *Nat Commun.* – 2023. – T. 14, № 1. – C. 2463.

267. Lajoie M. J., Boyken S. E., Salter A. I., Bruffey J., Rajan A., Langan R. A., Olshefsky A., Muhunthan V., Bick M. J., Gewe M., Quijano-Rubio A., Johnson J., Lenz G., Nguyen A., Pun S., Correnti C. E., Riddell S. R., Baker D. Designed protein logic to target cells with precise combinations of surface antigens // *Science.* – 2020. – T. 369, № 6511. – C. 1637-1643.

268. Cartellieri M., Feldmann A., Koristka S., Arndt C., Loff S., Ehninger A., von Bonin M., Bejestani E. P., Ehninger G., Bachmann M. P. Switching CAR T cells on and off: a novel modular platform for retargeting of T cells to AML blasts // *Blood Cancer J.* – 2016. – T. 6, № 8. – C. e458.

269. Albert S., Arndt C., Feldmann A., Bergmann R., Bachmann D., Koristka S., Ludwig F., Ziller-Walter P., Kegler A., Gartner S., Schmitz M., Ehninger A., Cartellieri M., Ehninger G., Pietzsch H. J., Pietzsch J., Steinbach J., Bachmann M. A novel nanobody-based target module for retargeting of T lymphocytes to EGFR-expressing cancer cells via the modular UniCAR platform // *Oncoimmunology.* – 2017. – T. 6, № 4. – C. e1287246.

270. Loureiro L. R., Feldmann A., Bergmann R., Koristka S., Berndt N., Mathe D., Hegedus N., Szigeti K., Videira P. A., Bachmann M., Arndt C. Extended half-life target module for sustainable UniCAR T-cell treatment of STn-expressing cancers // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2020. – T. 39, № 1. – C. 77.

271. Loureiro L. R., Feldmann A., Bergmann R., Koristka S., Berndt N., Arndt C., Pietzsch J., Novo C., Videira P., Bachmann M. Development of a novel target module redirecting UniCAR T cells to Sialyl Tn-expressing tumor cells // *Blood Cancer J.* – 2018. – T. 8, № 9. – C. 81.

272. Arndt C., Feldmann A., Koristka S., Schafer M., Bergmann R., Mitwasi N., Berndt N., Bachmann D., Kegler A., Schmitz M., Puentes-Cala E., Soto J. A., Ehninger G., Pietzsch J., Liolios C., Wunderlich G., Kotzerke J., Kopka K., Bachmann M. A theranostic PSMA ligand for PET imaging and retargeting of T cells expressing the universal chimeric antigen receptor UniCAR // *Oncoimmunology*. – 2019. – T. 8, № 11. – C. 1659095.
273. Feldmann A., Arndt C., Bergmann R., Loff S., Cartellieri M., Bachmann D., Aliperta R., Hetzenecker M., Ludwig F., Albert S., Ziller-Walter P., Kegler A., Koristka S., Gartner S., Schmitz M., Ehninger A., Ehninger G., Pietzsch J., Steinbach J., Bachmann M. Retargeting of T lymphocytes to PSCA- or PSMA positive prostate cancer cells using the novel modular chimeric antigen receptor platform technology "UniCAR" // *Oncotarget*. – 2017. – T. 8, № 19. – C. 31368-31385.
274. Bachmann D., Aliperta R., Bergmann R., Feldmann A., Koristka S., Arndt C., Loff S., Welzel P., Albert S., Kegler A., Ehninger A., Cartellieri M., Ehninger G., Bornhauser M., von Bonin M., Werner C., Pietzsch J., Steinbach J., Bachmann M. Retargeting of UniCAR T cells with an in vivo synthesized target module directed against CD19 positive tumor cells // *Oncotarget*. – 2018. – T. 9, № 7. – C. 7487-7500.
275. Ozdemir B. C., Pentcheva-Hoang T., Carstens J. L., Zheng X., Wu C. C., Simpson T. R., Laklai H., Sugimoto H., Kahlert C., Novitskiy S. V., De Jesus-Acosta A., Sharma P., Heidari P., Mahmood U., Chin L., Moses H. L., Weaver V. M., Maitra A., Allison J. P., LeBleu V. S., Kalluri R. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival // *Cancer Cell*. – 2014. – T. 25, № 6. – C. 719-34.
276. Dvorak H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing // *N Engl J Med*. – 1986. – T. 315, № 26. – C. 1650-9.
277. Vaupel P. Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis // *Oncologist*. – 2008. – T. 13 Suppl 3. – C. 21-6.
278. Samanta D., Gilkes D. M., Chaturvedi P., Xiang L., Semenza G. L. Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2014. – T. 111, № 50. – C. E5429-38.
279. Rankin E. B., Giaccia A. J. Hypoxic control of metastasis // *Science*. – 2016. – T. 352, № 6282. – C. 175-80.
280. Pearce E. L., Poffenberger M. C., Chang C. H., Jones R. G. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function // *Science*. – 2013. – T. 342, № 6155. – C. 1242454.
281. Berahovich R., Liu X., Zhou H., Tsadik E., Xu S., Golubovskaya V., Wu L. Hypoxia Selectively Impairs CAR-T Cells In Vitro // *Cancers (Basel)*. – 2019. – T. 11, № 5.

282. Teijeira A., Labiano S., Garasa S., Etxeberria I., Santamaria E., Rouzaut A., Enamorado M., Azpilikueta A., Inoges S., Bolanos E., Aznar M. A., Sanchez-Paulete A. R., Sancho D., Melero I. Mitochondrial Morphological and Functional Reprogramming Following CD137 (4-1BB) Costimulation // *Cancer Immunol Res.* – 2018. – T. 6, № 7. – C. 798-811.
283. Zhang H., Snyder K. M., Suhoski M. M., Maus M. V., Kapoor V., June C. H., Mackall C. L. 4-1BB is superior to CD28 costimulation for generating CD8⁺ cytotoxic lymphocytes for adoptive immunotherapy // *J Immunol.* – 2007. – T. 179, № 7. – C. 4910-8.
284. Joyce J. A., Pollard J. W. Microenvironmental regulation of metastasis // *Nat Rev Cancer.* – 2009. – T. 9, № 4. – C. 239-52.
285. Tormoen G. W., Crittenden M. R., Gough M. J. Role of the immunosuppressive microenvironment in immunotherapy // *Adv Radiat Oncol.* – 2018. – T. 3, № 4. – C. 520-526.
286. Parry R. V., Chemnitz J. M., Frauwirth K. A., Lanfranco A. R., Braunstein I., Kobayashi S. V., Linsley P. S., Thompson C. B., Riley J. L. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms // *Mol Cell Biol.* – 2005. – T. 25, № 21. – C. 9543-53.
287. Buchbinder E. I., Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition // *Am J Clin Oncol.* – 2016. – T. 39, № 1. – C. 98-106.
288. Lin D. Y., Tanaka Y., Iwasaki M., Gittis A. G., Su H. P., Mikami B., Okazaki T., Honjo T., Minato N., Garboczi D. N. The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – T. 105, № 8. – C. 3011-6.
289. Keir M. E., Butte M. J., Freeman G. J., Sharpe A. H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity // *Annu Rev Immunol.* – 2008. – T. 26. – C. 677-704.
290. Tumeh P. C., Harview C. L., Yearley J. H., Shintaku I. P., Taylor E. J., Robert L., Chmielowski B., Spasic M., Henry G., Ciobanu V., West A. N., Carmona M., Kivork C., Seja E., Cherry G., Gutierrez A. J., Grogan T. R., Mateus C., Tomasic G., Glaspy J. A., Emerson R. O., Robins H., Pierce R. H., Elashoff D. A., Robert C., Ribas A. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance // *Nature.* – 2014. – T. 515, № 7528. – C. 568-71.
291. Ribas A., Wolchok J. D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade // *Science.* – 2018. – T. 359, № 6382. – C. 1350-1355.
292. Cherkassky L., Morello A., Villena-Vargas J., Feng Y., Dimitrov D. S., Jones D. R., Sadelain M., Adusumilli P. S. Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition // *J Clin Invest.* – 2016. – T. 126, № 8. – C. 3130-44.
293. Wing A., Fajardo C. A., Posey A. D., Jr., Shaw C., Da T., Young R. M., Alemany R., June C. H., Guedan S. Improving CART-Cell Therapy of Solid Tumors with Oncolytic Virus-Driven

Production of a Bispecific T-cell Engager // *Cancer Immunol Res.* – 2018. – T. 6, № 5. – C. 605-616.

294. John L. B., Devaud C., Duong C. P., Yong C. S., Beavis P. A., Haynes N. M., Chow M. T., Smyth M. J., Kershaw M. H., Darcy P. K. Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells // *Clin Cancer Res.* – 2013. – T. 19, № 20. – C. 5636-46.

295. Grosser R., Cherkassky L., Chintala N., Adusumilli P. S. Combination Immunotherapy with CAR T Cells and Checkpoint Blockade for the Treatment of Solid Tumors // *Cancer Cell.* – 2019. – T. 36, № 5. – C. 471-482.

296. Heczey A., Louis C. U., Savoldo B., Dakhova O., Durett A., Grilley B., Liu H., Wu M. F., Mei Z., Gee A., Mehta B., Zhang H., Mahmood N., Tashiro H., Heslop H. E., Dotti G., Rooney C. M., Brenner M. K. CAR T Cells Administered in Combination with Lymphodepletion and PD-1 Inhibition to Patients with Neuroblastoma // *Mol Ther.* – 2017. – T. 25, № 9. – C. 2214-2224.

297. Chong E. A., Melenhorst J. J., Lacey S. F., Ambrose D. E., Gonzalez V., Levine B. L., June C. H., Schuster S. J. PD-1 blockade modulates chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells: refueling the CAR // *Blood.* – 2017. – T. 129, № 8. – C. 1039-1041.

298. Herbst R. S., Baas P., Kim D. W., Felip E., Perez-Gracia J. L., Han J. Y., Molina J., Kim J. H., Arvis C. D., Ahn M. J., Majem M., Fidler M. J., de Castro G., Jr., Garrido M., Lubiniecki G. M., Shentu Y., Im E., Dolled-Filhart M., Garon E. B. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial // *Lancet.* – 2016. – T. 387, № 10027. – C. 1540-1550.

299. Tadokoro T., Keshino E., Makiyama A., Sasaguri T., Ohshima K., Katano H., Mohri M. Acute Lymphocytic Myocarditis With Anti-PD-1 Antibody Nivolumab // *Circ Heart Fail.* – 2016. – T. 9, № 10.

300. Geisler B. P., Raad R. A., Esaian D., Sharon E., Schwartz D. R. Apical ballooning and cardiomyopathy in a melanoma patient treated with ipilimumab: a case of takotsubo-like syndrome // *J Immunother Cancer.* – 2015. – T. 3. – C. 4.

301. Puzanov I., Diab A., Abdallah K., Bingham C. O., 3rd, Brogdon C., Dadu R., Hamad L., Kim S., Lacouture M. E., LeBoeuf N. R., Lenihan D., Onofrei C., Shannon V., Sharma R., Silk A. W., Skondra D., Suarez-Almazor M. E., Wang Y., Wiley K., Kaufman H. L., Ernstoff M. S., Society for Immunotherapy of Cancer Toxicity Management Working G. Managing toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: consensus recommendations from the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) Toxicity Management Working Group // *J Immunother Cancer.* – 2017. – T. 5, № 1. – C. 95.

302. Rafiq S., Yeku O. O., Jackson H. J., Purdon T. J., van Leeuwen D. G., Drakes D. J., Song M., Miele M. M., Li Z., Wang P., Yan S., Xiang J., Ma X., Seshan V. E., Hendrickson R. C., Liu C., Brentjens R. J. Targeted delivery of a PD-1-blocking scFv by CAR-T cells enhances anti-tumor efficacy in vivo // *Nat Biotechnol.* – 2018. – T. 36, № 9. – C. 847-856.
303. Suarez E. R., Chang de K., Sun J., Sui J., Freeman G. J., Signoretti S., Zhu Q., Marasco W. A. Chimeric antigen receptor T cells secreting anti-PD-L1 antibodies more effectively regress renal cell carcinoma in a humanized mouse model // *Oncotarget.* – 2016. – T. 7, № 23. – C. 34341-55.
304. Liu X., Ranganathan R., Jiang S., Fang C., Sun J., Kim S., Newick K., Lo A., June C. H., Zhao Y., Moon E. K. A Chimeric Switch-Receptor Targeting PD1 Augments the Efficacy of Second-Generation CAR T Cells in Advanced Solid Tumors // *Cancer Res.* – 2016. – T. 76, № 6. – C. 1578-90.
305. Odorizzi P. M., Pauken K. E., Paley M. A., Sharpe A., Wherry E. J. Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8⁺ T cells // *J Exp Med.* – 2015. – T. 212, № 7. – C. 1125-37.
306. Wei J., Luo C., Wang Y., Guo Y., Dai H., Tong C., Ti D., Wu Z., Han W. PD-1 silencing impairs the anti-tumor function of chimeric antigen receptor modified T cells by inhibiting proliferation activity // *J Immunother Cancer.* – 2019. – T. 7, № 1. – C. 209.
307. Stadtmauer E. A., Fraietta J. A., Davis M. M., Cohen A. D., Weber K. L., Lancaster E., Mangan P. A., Kulikovskaya I., Gupta M., Chen F., Tian L., Gonzalez V. E., Xu J., Jung I. Y., Melenhorst J. J., Plesa G., Shea J., Matlawski T., Cervini A., Gaymon A. L., Desjardins S., Lamontagne A., Salas-Mckee J., Fesnak A., Siegel D. L., Levine B. L., Jadowsky J. K., Young R. M., Chew A., Hwang W. T., Hexner E. O., Carreno B. M., Nobles C. L., Bushman F. D., Parker K. R., Qi Y., Satpathy A. T., Chang H. Y., Zhao Y., Lacey S. F., June C. H. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer // *Science.* – 2020. – T. 367, № 6481.
308. Volkov D. V., Tetz G. V., Rubtsov Y. P., Stepanov A. V., Gabibov A. G. Neutrophil Extracellular Traps (NETs): Opportunities for Targeted Therapy // *Acta Naturae.* – 2021. – T. 13, № 3. – C. 15-23.
309. Huang X., Nepovimova E., Adam V., Sivak L., Heger Z., Valko M., Wu Q., Kuca K. Neutrophils in Cancer immunotherapy: friends or foes? // *Mol Cancer.* – 2024. – T. 23, № 1. – C. 107.
310. Hedrick C. C., Malanchi I. Neutrophils in cancer: heterogeneous and multifaceted // *Nat Rev Immunol.* – 2022. – T. 22, № 3. – C. 173-187.
311. Donskov F. Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials // *Semin Cancer Biol.* – 2013. – T. 23, № 3. – C. 200-7.

312. Saied A., Licata L., Burga R. A., Thorn M., McCormack E., Stainken B. F., Assanah E. O., Khare P. D., Davies R., Espat N. J., Junghans R. P., Katz S. C. Neutrophil:lymphocyte ratios and serum cytokine changes after hepatic artery chimeric antigen receptor-modified T-cell infusions for liver metastases // *Cancer Gene Ther.* – 2014. – T. 21, № 11. – C. 457-62.
313. Branzk N., Lubojemska A., Hardison S. E., Wang Q., Gutierrez M. G., Brown G. D., Papayannopoulos V. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens // *Nat Immunol.* – 2014. – T. 15, № 11. – C. 1017-25.
314. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // *Science.* – 2004. – T. 303, № 5663. – C. 1532-5.
315. Berger-Achituv S., Brinkmann V., Abed U. A., Kuhn L. I., Ben-Ezra J., Elhasid R., Zychlinsky A. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting // *Front Immunol.* – 2013. – T. 4. – C. 48.
316. Oklu R., Sheth R. A., Wong K. H. K., Jahromi A. H., Albadawi H. Neutrophil extracellular traps are increased in cancer patients but does not associate with venous thrombosis // *Cardiovasc Diagn Ther.* – 2017. – T. 7, № Suppl 3. – C. S140-S149.
317. Richardson J. J. R., Hendrickse C., Gao-Smith F., Thickett D. R. Neutrophil Extracellular Trap Production in Patients with Colorectal Cancer In Vitro // *Int J Inflam.* – 2017. – T. 2017. – C. 4915062.
318. Xia Y., He J., Zhang H., Wang H., Tetz G., Maguire C. A., Wang Y., Onuma A., Genkin D., Tetz V., Stepanov A., Terekhov S., Ukrainskaya V., Huang H., 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 // *Mol Oncol.* – 2020. – T. 14, № 11. – C. 2920-2935.
319. Bebelman M. P., Smit M. J., Pegtel D. M., Baglio S. R. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer // *Pharmacol Ther.* – 2018. – T. 188. – C. 1-11.
320. Valadi H., Ekstrom K., Bossios A., Sjostrand M., Lee J. J., Lotvall J. O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells // *Nat Cell Biol.* – 2007. – T. 9, № 6. – C. 654-9.
321. Mulcahy L. A., Pink R. C., Carter D. R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake // *J Extracell Vesicles.* – 2014. – T. 3.
322. Lv L. H., Wan Y. L., Lin Y., Zhang W., Yang M., Li G. L., Lin H. M., Shang C. Z., Chen Y. J., Min J. Anticancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human

hepatocellular carcinoma cells that elicit effective natural killer cell antitumor responses in vitro // J Biol Chem. – 2012. – T. 287, № 19. – C. 15874-85.

323. Lespagnol A., Duflaut D., Beekman C., Blanc L., Fiucci G., Marine J. C., Vidal M., Amson R., Telerman A. Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice // Cell Death Differ. – 2008. – T. 15, № 11. – C. 1723-33.

324. Brinton L. T., Sloane H. S., Kester M., Kelly K. A. Formation and role of exosomes in cancer // Cell Mol Life Sci. – 2015. – T. 72, № 4. – C. 659-71.

325. Parolini I., Federici C., Raggi C., Lugini L., Palleschi S., De Milito A., Coscia C., Iessi E., Logozzi M., Molinari A., Colone M., Tatti M., Sargiacomo M., Fais S. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells // J Biol Chem. – 2009. – T. 284, № 49. – C. 34211-22.

326. Stefan N., Martin-Killias P., Wyss-Stoeckle S., Honegger A., Zangemeister-Wittke U., Pluckthun A. DARPins recognizing the tumor-associated antigen EpCAM selected by phage and ribosome display and engineered for multivalency // J Mol Biol. – 2011. – T. 413, № 4. – C. 826-43.

327. Vorobyeva A., Schulga A., Konovalova E., Guler R., Lofblom J., Sandstrom M., Garousi J., Chernov V., Bragina O., Orlova A., Tolmachev V., Deyev S. M. Optimal composition and position of histidine-containing tags improves biodistribution of (99m)Tc-labeled DARPIn G3 // Sci Rep. – 2019. – T. 9, № 1. – C. 9405.

328. Deyev S. M., Waibel R., Lebedenko E. N., Schubiger A. P., Pluckthun A. Design of multivalent complexes using the barnase*barstar module // Nat Biotechnol. – 2003. – T. 21, № 12. – C. 1486-92.

329. Shipunova V. O., Zelepukin I. V., Stremovskiy O. A., Nikitin M. P., Care A., Sunna A., Zvyagin A. V., Deyev S. M. Versatile Platform for Nanoparticle Surface Bioengineering Based on SiO(2)-Binding Peptide and Proteinaceous Barnase*Barstar Interface // ACS Appl Mater Interfaces. – 2018. – T. 10, № 20. – C. 17437-17447.

330. Zhang H., Yea K., Xie J., Ruiz D., Wilson I. A., Lerner R. A. Selecting agonists from single cells infected with combinatorial antibody libraries // Chem Biol. – 2013. – T. 20, № 5. – C. 734-41.

331. Xie J., Zhang H., Yea K., Lerner R. A. Autocrine signaling based selection of combinatorial antibodies that transdifferentiate human stem cells // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2013. – T. 110, № 20. – C. 8099-104.

332. Binley K. E., Ng W. S., Barde Y. A., Song B., Morgan J. E. Brain-derived neurotrophic factor prevents dendritic retraction of adult mouse retinal ganglion cells // *Eur J Neurosci.* – 2016. – Т. 44, № 3. – С. 2028-39.
333. Fiorenza S., Ritchie D. S., Ramsey S. D., Turtle C. J., Roth J. A. Value and affordability of CAR T-cell therapy in the United States // *Bone Marrow Transplant.* – 2020. – Т. 55, № 9. – С. 1706-1715.
334. Stepanov A. V., Markov O. V., Chernikov I. V., Gladkikh D. V., Zhang H., Jones T., Sen'kova A. V., Chernolovskaya E. L., Zenkova M. A., Kalinin R. S., Rubtsova M. P., Meleshko A. N., Genkin D. D., Belogurov A. A., Jr., Xie J., Gabibov A. G., Lerner R. A. Autocrine-based selection of ligands for personalized CAR-T therapy of lymphoma // *Sci Adv.* – 2018. – Т. 4, № 11. – С. eaau4580.
335. Калинин Р. С. Комбинаторные подходы к созданию специфических химерных антигенных рецепторов Т-клеток и методы регулирования их активности. – диссертация канд. биол. наук: 1.5.3 - ФГБУН ГНЦ ИБХ РАН, Москва, 2022 - 140 с, 2022.
336. Huang J., Alexey S., Li J., Jones T., Grande G., Douthit L., Xie J., Chen D., Wu X., Michael M., Xiao C., Zhao J., Xie X., Xie J., Chen X. L., Fu G., Alexander G., Tzeng C. M. Unique CDR3 epitope targeting by CAR-T cells is a viable approach for treating T-cell malignancies // *Leukemia.* – 2019. – Т. 33, № 9. – С. 2315-2319.
337. Merkouris S., Barde Y. A., Binley K. E., Allen N. D., Stepanov A. V., Wu N. C., Grande G., Lin C. W., Li M., Nan X., Chacon-Fernandez P., DiStefano P. S., Lindsay R. M., Lerner R. A., Xie J. Fully human agonist antibodies to TrkB using autocrine cell-based selection from a combinatorial antibody library // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2018. – Т. 115, № 30. – С. E7023-E7032.
338. Lee Y. G., Chu H., Lu Y., Leamon C. P., Srinivasarao M., Putt K. S., Low P. S. Regulation of CAR T cell-mediated cytokine release syndrome-like toxicity using low molecular weight adapters // *Nat Commun.* – 2019. – Т. 10, № 1. – С. 2681.
339. Rader C., Turner J. M., Heine A., Shabat D., Sinha S. C., Wilson I. A., Lerner R. A., Barbas C. F. A humanized aldolase antibody for selective chemotherapy and adaptor immunotherapy // *J Mol Biol.* – 2003. – Т. 332, № 4. – С. 889-99.
340. Brenner S., Lerner R. A. Encoded combinatorial chemistry // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1992. – Т. 89, № 12. – С. 5381-3.
341. Stepanov A. V., Xie J., Zhu Q., Shen Z., Su W., Kuai L., Soll R., Rader C., Shaver G., Douthit L., Zhang D., Kalinin R., Fu X., Zhao Y., Qin T., Baran P. S., Gabibov A. G., Bushnell D., Neri D., Kornberg R. D., Lerner R. A. Control of the antitumour activity and specificity of

- CAR T cells via organic adapters covalently tethering the CAR to tumour cells // *Nat Biomed Eng.* – 2024. – T. 8, № 5. – C. 529-543.
342. Mironova K. E., Chernykh O. N., Ryabova A. V., Stremovskiy O. A., Proshkina G. M., Deyev S. M. Highly specific hybrid protein DARPIn-mCherry for fluorescent visualization of cells overexpressing tumor marker HER2/neu // *Biochemistry (Mosc).* – 2014. – T. 79, № 12. – C. 1391-6.
343. Zahnd C., Wyler E., Schwenk J. M., Steiner D., Lawrence M. C., McKern N. M., Pecorari F., Ward C. W., Joos T. O., Pluckthun A. A designed ankyrin repeat protein evolved to picomolar affinity to Her2 // *J Mol Biol.* – 2007. – T. 369, № 4. – C. 1015-28.
344. Steiner D., Forrer P., Pluckthun A. Efficient selection of DARPins with sub-nanomolar affinities using SRP phage display // *J Mol Biol.* – 2008. – T. 382, № 5. – C. 1211-27.
345. Korchuganov D. S., Shul'ga A. A., Ermoliuk Ia S., Mit'kevich V. A., Reibarkh M., Nol'de S. B., Makarov A. A., Arsen'ev A. S., Kirpichnikov M. P. [I87E mutation prevents barstar dimerization] // *Bioorg Khim.* – 2004. – T. 30, № 6. – C. 638-43.
346. Makarov A. A., Kolchinsky A., Ilinskaya O. N. Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents // *Bioessays.* – 2008. – T. 30, № 8. – C. 781-90.
347. Fang E. F., Ng T. B. Ribonucleases of different origins with a wide spectrum of medicinal applications // *Biochim Biophys Acta.* – 2011. – T. 1815, № 1. – C. 65-74.
348. Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. Barnase and binase: twins with distinct fates // *FEBS J.* – 2011. – T. 278, № 19. – C. 3633-43.
349. Komedchikova E. N., Kolesnikova O. A., Tereshina E. D., Kotelnikova P. A., Sogomonyan A. S., Stepanov A. V., Deyev S. M., Nikitin M. P., Shipunova V. O. Two-Step Targeted Drug Delivery via Proteinaceous Barnase-Barstar Interface and Doxorubicin-Loaded Nano-PLGA Outperforms One-Step Strategy for Targeted Delivery to HER2-Overexpressing Cells // *Pharmaceutics.* – 2022. – T. 15, № 1.
350. Stepanov A. V., Kalinin R. S., Shipunova V. O., Zhang D., Xie J., Rubtsov Y. P., Ukrainskaya V. M., Schulga A., Konovalova E. V., Volkov D. V., Yaroshevich I. A., Moysenovich A. M., Belogurov A. A., Jr., Zhang H., Telegin G. B., Chernov A. S., Maschan M. A., Terekhov S. S., Wu P., Deyev S. M., Lerner R. A., Gabibov A. G., Altman S. Switchable targeting of solid tumors by BsCAR T cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2022. – T. 119, № 46. – C. e2210562119.
351. Kalinin R. S., Petukhov A. V., Knorre V. D., Maschan M. A., Stepanov A. V., Gabibov A. G. Molecular Approaches to Safe and Controlled Engineered T-cell Therapy // *Acta Naturae.* – 2018. – T. 10, № 2. – C. 16-23.

352. Yao S., Hahn T., Zhang Y., Haven D., Senneka M., Dunford L., Parsons S., Confer D., McCarthy P. L. Unrelated donor allogeneic hematopoietic cell transplantation is underused as a curative therapy in eligible patients from the United States // *Biol Blood Marrow Transplant.* – 2013. – T. 19, № 10. – C. 1459-64.
353. Zeiser R., Blazar B. R. Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy // *N Engl J Med.* – 2017. – T. 377, № 22. – C. 2167-2179.
354. Ebens C. L., MacMillan M. L., Wagner J. E. Hematopoietic cell transplantation in Fanconi anemia: current evidence, challenges and recommendations // *Expert Rev Hematol.* – 2017. – T. 10, № 1. – C. 81-97.
355. Giardino S., de Latour R. P., Aljurf M., Eikema D. J., Bosman P., Bertrand Y., Tbakhi A., Holter W., Bornhauser M., Rossig C., Burkhardt B., Zecca M., Afanasyev B., Michel G., Ganser A., Alseraihy A., Ayas M., Uckan-Cetinkaya D., Bruno B., Patrick K., Bader P., Itala-Remes M., Rocha V., Jubert C., Diaz M. A., Shaw P. J., Junior L. G. D., Locatelli F., Kroger N., Faraci M., Pierri F., Lanino E., Miano M., Risitano A., Robin M., Dufour C., Severe Aplastic A., Chronic Malignancies Working Parties of European B., Marrow Transplantation g. Outcome of patients with Fanconi anemia developing myelodysplasia and acute leukemia who received allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A retrospective analysis on behalf of EBMT group // *Am J Hematol.* – 2020. – T. 95, № 7. – C. 809-816.
356. Slack J., Albert M. H., Balashov D., Belohradsky B. H., Bertaina A., Bleesing J., Booth C., Buechner J., Buckley R. H., Ouachee-Chardin M., Deripapa E., Drabko K., Eapen M., Feuchtinger T., Finocchi A., Gaspar H. B., Ghosh S., Gillio A., Gonzalez-Granado L. I., Grunebaum E., Gungor T., Heilmann C., Helminen M., Higuchi K., Imai K., Kalwak K., Kanazawa N., Karasu G., Kucuk Z. Y., Laberko A., Lange A., Mahlaoui N., Meisel R., Moshous D., Muramatsu H., Parikh S., Pasic S., Schmid I., Schuetz C., Schulz A., Schultz K. R., Shaw P. J., Slatter M. A., Sykora K. W., Tamura S., Taskinen M., Wawer A., Wolska-Kusnierz B., Cowan M. J., Fischer A., Gennery A. R., Inborn Errors Working Party of the European Society for B., Marrow T., the European Society for I., Stem Cell Transplant for Immunodeficiencies in E., Center for International B., Marrow Transplant R., Primary Immunodeficiency Treatment C. Outcome of hematopoietic cell transplantation for DNA double-strand break repair disorders // *J Allergy Clin Immunol.* – 2018. – T. 141, № 1. – C. 322-328 e10.
357. Qiu Y., Wan C. L., Xu M. Z., Zhou H. X., Liu M. J., Gong W. J., Kang L. Q., Sun A. N., Yu L., Wu D. P., Qian C. S., Xue S. L. Safety and efficacy of CD22 and CD19 CAR-T bridging auto-HSCT as consolidation therapy for AYA and adult B-ALL // *Blood Cancer J.* – 2023. – T. 13, № 1. – C. 66.

358. Liu J., Xu M., Zhang X., Zhang Z., Zhong T., Yu H., Fu Y., Meng H., Feng J., Zou X., Han X., Kang L., Yu L., Li L. CD19 chimeric antigen receptor-T cells as bridging therapy to allogeneic hematopoietic cell transplantation improves outcome in patients with refractory/relapsed B-cell acute lymphoblastic leukemia // *Heliyon*. – 2024. – T. 10, № 13. – C. e33937.
359. Myburgh R., Kiefer J. D., Russkamp N. F., Magnani C. F., Nunez N., Simonis A., Pfister S., Wilk C. M., McHugh D., Friemel J., Muller A. M., Becher B., Munz C., van den Broek M., Neri D., Manz M. G. Anti-human CD117 CAR T-cells efficiently eliminate healthy and malignant CD117-expressing hematopoietic cells // *Leukemia*. – 2020. – T. 34, № 10. – C. 2688-2703.
360. Arai Y., Choi U., Corsino C. I., Koontz S. M., Tajima M., Sweeney C. L., Black M. A., Feldman S. A., Dinauer M. C., Malech H. L. Myeloid Conditioning with c-kit-Targeted CAR-T Cells Enables Donor Stem Cell Engraftment // *Mol Ther*. – 2018. – T. 26, № 5. – C. 1181-1197.
361. Sugita M., Galetto R., Zong H., Ewing-Crystal N., Trujillo-Alonso V., Mencia-Trinchant N., Yip W., Filipe S., Lebuhotel C., Gouble A., Hassane D. C., Smith J., Roboz G. J., Guzman M. L. Allogeneic TCR α beta deficient CAR T-cells targeting CD123 in acute myeloid leukemia // *Nat Commun*. – 2022. – T. 13, № 1. – C. 2227.
362. El Khawanky N., Hughes A., Yu W., Myburgh R., Matschulla T., Taromi S., Aumann K., Clarkson J., Vinnakota J. M., Shoumariyeh K., Miething C., Lopez A. F., Brown M. P., Duyster J., Hein L., Manz M. G., Hughes T. P., White D. L., Yong A. S. M., Zeiser R. Demethylating therapy increases anti-CD123 CAR T cell cytotoxicity against acute myeloid leukemia // *Nat Commun*. – 2021. – T. 12, № 1. – C. 6436.
363. Pagel J. M., Gooley T. A., Rajendran J., Fisher D. R., Wilson W. A., Sandmaier B. M., Matthews D. C., Deeg H. J., Gopal A. K., Martin P. J., Storb R. F., Press O. W., Appelbaum F. R. Allogeneic hematopoietic cell transplantation after conditioning with 131I-anti-CD45 antibody plus fludarabine and low-dose total body irradiation for elderly patients with advanced acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome // *Blood*. – 2009. – T. 114, № 27. – C. 5444-53.
364. Vo P., Gooley T. A., Rajendran J. G., Fisher D. R., Orozco J. J., Green D. J., Gopal A. K., Haaf R., Nartea M., Storb R., Appelbaum F. R., Press O. W., Pagel J. M., Sandmaier B. M. Yttrium-90-labeled anti-CD45 antibody followed by a reduced-intensity hematopoietic cell transplantation for patients with relapsed/refractory leukemia or myelodysplasia // *Haematologica*. – 2020. – T. 105, № 6. – C. 1731-1737.
365. Wellhausen N., O'Connell R. P., Lesch S., Engel N. W., Rennels A. K., Gonzales D., Herbst F., Young R. M., Garcia K. C., Weiner D., June C. H., Gill S. I. Epitope base editing CD45 in

- hematopoietic cells enables universal blood cancer immune therapy // *Sci Transl Med.* – 2023. – T. 15, № 714. – C. eadi1145.
366. Matesan M., Fisher D. R., Wong R., Gopal A. K., Green D. J., Sandmaier B. M., Bensinger W., Pagel J. M., Orozco J., Press O. W., Cassaday R. D., Hutchinson E., Wanner M., Pal S., Thostenson C., Rajendran J. G. Biokinetics of radiolabeled monoclonal antibody BC8: Differences in biodistribution and dosimetry among hematologic malignancies // *J. Nucl. Med.* – 2020. – T. 61, № 9. – C. 1300-1306.
367. Matthews D. C., Martin P. J., Nourigat C., Appelbaum F. R., Fisher D. R., Bernstein I. D. Marrow ablative and immunosuppressive effects of ¹³¹I-anti-CD45 antibody in congenic and H2-mismatched Murine transplant models // *Blood.* – 1999. – T. 93, № 2. – C. 737-745.
368. Orozco J. J., Kenoyer A., Balkin E. R., Gooley T. A., Hamlin D. K., Wilbur D. S., Hylarides M. D., Frost S. H. L., Mawad R., O'Donnell P., Sandmaier B. M., Fuchs E. J., Luznik L., Green D. J., Gopal A. K., Press O. W., Pagel J. M. Anti-CD45 radioimmunotherapy without TBI before transplantation facilitates persistent haploidentical donor engraftment // *Blood.* – 2016. – T. 127, № 3. – C. 352-359.
369. Castiello M. C., Bosticardo M., Sacchetti N., Calzoni E., Fontana E., Yamazaki Y., Draghici E., Corsino C., Bortolomai I., Sereni L., Yu H.-H., Uva P., Palchaudhuri R., Scadden D. T., Villa A., Notarangelo L. D. Efficacy and safety of anti-CD45-saporin as conditioning agent for RAG deficiency // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2021. – T. 147, № 1. – C. 309-320.e6.
370. Ludwig D., Bryan R., Dawicki W., Geoghegan E. M., Liang Q., Seth S., Gokhale M., Berger M. S., Reddy V., Garg R., Allen K., Dadachova E. Preclinical development of an Actinium-225-labeled antibody radio-conjugate directed against CD45 for targeted conditioning and radioimmunotherapy // *Blood.* – 2019. – T. 134, № Supplement_1. – C. 5601-5601.
371. Watanabe N., Mo F., Zheng R., Ma R., Bray V. C., van Leeuwen D. G., Sritabal-Ramirez J., Hu H., Wang S., Mehta B., Srinivasan M., Scherer L. D., Zhang H., Thakkar S. G., Hill L. C., Heslop H. E., Cheng C., Brenner M. K., Mamonkin M. Feasibility and preclinical efficacy of CD7-unedited CD7 CAR T cells for T cell malignancies // *Mol. Ther.* – 2023. – T. 31, № 1. – C. 24-34.
372. Haubner S., Subklewe M., Sadelain M. Honing CAR T cells to tackle acute myeloid leukemia // *Blood.* – 2025. – T. 145, № 11. – C. 1113-1125.
373. Morillon Y. M., Sabzevari A., Schlom J., Greiner J. W. The development of next-generation PBMC humanized mice for preclinical investigation of cancer immunotherapeutic agents // *Anticancer Res.* – 2020. – T. 40, № 10. – C. 5329-5341.
374. Budde L. E., Berger C., Lin Y., Wang J., Lin X., Frayo S. E., Brouns S. A., Spencer D. M., Till B. G., Jensen M. C., Riddell S. R., Press O. W. Combining a CD20 chimeric antigen

- receptor and an inducible caspase 9 suicide switch to improve the efficacy and safety of T cell adoptive immunotherapy for lymphoma // *PLoS One*. – 2013. – T. 8, № 12. – C. e82742.
375. Kieback E., Charo J., Sommermeyer D., Blankenstein T., Uckert W. A safeguard eliminates T cell receptor gene-modified autoreactive T cells after adoptive transfer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – T. 105, № 2. – C. 623-628.
376. Stepanov A. V., Kalinin R. S., Shipunova V. O., Zhang D., Xie J., Rubtsov Y. P., Ukrainskaya V. M., Schulga A., Konovalova E. V., Volkov D. V., Yaroshevich I. A., Moysenovich A. M., Belogurov A. A., Jr., Zhang H., Telegin G. B., Chernov A. S., Maschan M. A., Terekhov S. S., Wu P., Deyev S. M., Lerner R. A., Gabibov A. G., Altman S. Switchable targeting of solid tumors by BsCAR T cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2022. – T. 119, № 46. – C. e2210562119.
377. Stepanov A. V., Xie J., Zhu Q., Shen Z., Su W., Kuai L., Soll R., Rader C., Shaver G., Douthit L., Zhang D., Kalinin R., Fu X., Zhao Y., Qin T., Baran P. S., Gabibov A. G., Bushnell D., Neri D., Kornberg R. D., Lerner R. A. Control of the antitumour activity and specificity of CAR T cells via organic adapters covalently tethering the CAR to tumour cells // *Nat. Biomed. Eng.* – 2024. – T. 8, № 5. – C. 529-543.
378. Wang X., Chang W.-C., Wong C. W., Colcher D., Sherman M., Ostberg J. R., Forman S. J., Riddell S. R., Jensen M. C. A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells // *Blood*. – 2011. – T. 118, № 5. – C. 1255-1263.
379. Stepanova V. M., Volkov D. V., Osipova D. S., Wang W., Hou Y., Pershin D. E., Fadeeva M. S., Malakhova E. A., Kulakovskaya E. A., Cuicui L., Mingfeng Z., Zhang H., Xie J., Zhang D., Mamedov I. Z., Chernov A. S., Telegin G. B., Rubtsov Y. P., Gabibov A. G., Wu P., Maschan M. A., Stepanov A. V. Targeting CD45 by gene-edited CAR T cells for leukemia eradication and hematopoietic stem cell transplantation preconditioning // *Mol Ther Oncol.* – 2024. – T. 32, № 3. – C. 200843.
380. Волков Д. В. Таргетирование пан-лейкоцитарного антигена CD45 и оптимизация эффекторной популяции для CAR T клеточной терапии гемопоэтических опухолей. – диссертация канд. биол. наук: 1.5.3 - ФГБУН ГНЦ ИБХ РАН, Москва, 2024 - 135 с, 2024.
381. Terakura S., Yamamoto T. N., Gardner R. A., Turtle C. J., Jensen M. C., Riddell S. R. Generation of CD19-chimeric antigen receptor modified CD8⁺ T cells derived from virus-specific central memory T cells // *Blood*. – 2012. – T. 119, № 1. – C. 72-82.
382. Chan W. K., Suwannasaen D., Throm R. E., Li Y., Eldridge P. W., Houston J., Gray J. T., Pui C. H., Leung W. Chimeric antigen receptor-redirected CD45RA-negative T cells have potent antileukemia and pathogen memory response without graft-versus-host activity // *Leukemia*. – 2015. – T. 29, № 2. – C. 387-95.

383. Caimi P. F., Pacheco Sanchez G., Sharma A., Otegbeye F., Ahmed N., Rojas P., Patel S., Kleinsorge Block S., Schiavone J., Zamborsky K., Boughan K., Hillian A., Reese-Koc J., Maschan M., Dropulic B., Sekaly R.-P., de Lima M. Prophylactic tocilizumab prior to anti-CD19 CAR-T cell therapy for non-Hodgkin lymphoma // *Front. Immunol.* – 2021. – T. 12. – C. 745320.
384. Maschan M., Caimi P. F., Reese-Koc J., Sanchez G. P., Sharma A. A., Molostova O., Shelikhova L., Pershin D., Stepanov A., Muzalevskii Y., Suzart V. G., 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 R.-P., 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 // *Nat. Commun.* – 2021. – T. 12, № 1. – C. 7200.
385. 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 Adv.* – 2022. – T. 6, № 19. – C. 5582-5588.
386. Kamiya T., Wong D., Png Y. T., Campana D. A novel method to generate T-cell receptor-deficient chimeric antigen receptor T cells // *Blood Adv.* – 2018. – T. 2, № 5. – C. 517-528.
387. Tantaló D. G., Oliver A. J., von Scheidt B., Harrison A. J., Mueller S. N., Kershaw M. H., Slaney C. Y. Understanding T cell phenotype for the design of effective chimeric antigen receptor T cell therapies // *J Immunother Cancer.* – 2021. – T. 9, № 5.
388. Kalinin R. S., Ukrainskaya V. M., Chumakov S. P., Moysenovich A. M., Tereshchuk V. M., Volkov D. V., Pershin D. S., Maksimov E. G., Zhang H., Maschan M. A., Rubtsov Y. P., Stepanov A. V. Engineered Removal of PD-1 From the Surface of CD19 CAR-T Cells Results in Increased Activation and Diminished Survival // *Front Mol Biosci.* – 2021. – T. 8. – C. 745286.
389. Chen G., Huang A. C., Zhang W., Zhang G., Wu M., Xu W., Yu Z., Yang J., Wang B., Sun H., Xia H., Man Q., Zhong W., Antelo L. F., Wu B., Xiong X., Liu X., Guan L., Li T., Liu S., Yang R., Lu Y., Dong L., McGettigan S., Somasundaram R., Radhakrishnan R., Mills G., Lu Y., Kim J., Chen Y. H., Dong H., Zhao Y., Karakousis G. C., Mitchell T. C., Schuchter L. M., Herlyn M., Wherry E. J., Xu X., Guo W. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response // *Nature.* – 2018. – T. 560, № 7718. – C. 382-386.
390. Monypenny J., Milewicz H., Flores-Borja F., Weitsman G., Cheung A., Chowdhury R., Burgoyne T., Arulappu A., Lawler K., Barber P. R., Vicencio J. M., Keppler M., Wulaningsih W., Davidson S. M., Fraternali F., Woodman N., Turmaine M., Gillett C., Franz D., Quezada S. A., Futter C. E., Von Kriegsheim A., Kolch W., Vojnovic B., Carlton J. G., Ng T. ALIX

Regulates Tumor-Mediated Immunosuppression by Controlling EGFR Activity and PD-L1 Presentation // *Cell Rep.* – 2018. – T. 24, № 3. – С. 630-641.

391. Poggio M., Hu T., Pai C. C., Chu B., Belair C. D., Chang A., Montabana E., Lang U. E., Fu Q., Fong L., Blleloch R. Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory // *Cell.* – 2019. – T. 177, № 2. – С. 414-427 e13.

392. Suarez H., Gamez-Valero A., Reyes R., Lopez-Martin S., Rodriguez M. J., Carrascosa J. L., Cabanas C., Borrás F. E., Yanez-Mo M. A bead-assisted flow cytometry method for the semi-quantitative analysis of Extracellular Vesicles // *Sci Rep.* – 2017. – T. 7, № 1. – С. 11271.

393. Ukrainskaya V. M., Musatova O. E., Volkov D. V., Osipova D. S., Pershin D. S., Moysenovich A. M., Evtushenko E. G., Kulakovskaya E. A., Maksimov E. G., Zhang H., Rubtsov Y. P., Maschan M. A., Stepanov A. V., Gabibov A. G. CAR-tropic extracellular vesicles carry tumor-associated antigens and modulate CAR T cell functionality // *Sci Rep.* – 2023. – T. 13, № 1. – С. 463.

394. Ukrainskaya V. M., Rubtsov Y. P., Knorre V. D., Maschan M. A., Gabibov A. G., Stepanov A. V. The Role of Tumor-Derived Vesicles in the Regulation of Antitumor Immunity // *Acta Naturae.* – 2019. – T. 11, № 4. – С. 33-41.

395. Украинская В. М. Изучение влияния опухолевого микроокружения на противоопухолевую активность CAR Т-клеток. – диссертация канд. биол. наук: 1.5.3 - ФГБУН ГНЦ ИБХ РАН, Москва, 2021 - 118 с, 2021.

396. Theodoropoulos P. A., Gravanis A., Tsapara A., Margioris A. N., Papadogiorgaki E., Galanopoulos V., Stournaras C. Cytochalasin B may shorten actin filaments by a mechanism independent of barbed end capping // *Biochem Pharmacol.* – 1994. – T. 47, № 10. – С. 1875-81.

397. MacLean-Fletcher S., Pollard T. D. Mechanism of action of cytochalasin B on actin // *Cell.* – 1980. – T. 20, № 2. – С. 329-41.

398. Gomzikova M. O., Zhuravleva M. N., Miftakhova R. R., Arkhipova S. S., Evtugin V. G., Khaiboullina S. F., Kiyasov A. P., Persson J. L., Mongan N. P., Pestell R. G., Rizvanov A. A. Cytochalasin B-induced membrane vesicles convey angiogenic activity of parental cells // *Oncotarget.* – 2017. – T. 8, № 41. – С. 70496-70507.

399. 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. – T. 17, № 45. – С. e2102643.

400. Alekseeva L. A., Sen'kova A. V., Zenkova M. A., Mironova N. L. Targeting Circulating SINEs and LINEs with DNase I Provides Metastases Inhibition in Experimental Tumor Models // *Mol Ther Nucleic Acids*. – 2020. – T. 20. – C. 50-61.
401. Ulmer J. S., Herzka A., Toy K. J., Baker D. L., Dodge A. H., Sinicropi D., Shak S., Lazarus R. A. Engineering actin-resistant human DNase I for treatment of cystic fibrosis // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1996. – T. 93, № 16. – C. 8225-9.
402. Schwartz M. K., Likhite S., Vetter T. A., Baird M. C., McGovern V., Sierra Delgado A., Mendel T., Burghes A., Meyer K. C. In-depth comparison of Anc80L65 and AAV9 retinal targeting and characterization of cross-reactivity to multiple AAV serotypes in humans // *Mol Ther Methods Clin Dev*. – 2023. – T. 30. – C. 16-29.
403. Labanieh L., Mackall C. L. CAR immune cells: design principles, resistance and the next generation // *Nature*. – 2023. – T. 614, № 7949. – C. 635-648.
404. Sterner R. C., Sterner R. M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies // *Blood Cancer J*. – 2021. – T. 11, № 4. – C. 69.
405. Hou A. J., Chen L. C., Chen Y. Y. Navigating CAR-T cells through the solid-tumour microenvironment // *Nat Rev Drug Discov*. – 2021. – T. 20, № 7. – C. 531-550.
406. Shah N. N., Fry T. J. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy // *Nat Rev Clin Oncol*. – 2019. – T. 16, № 6. – C. 372-385.
407. Neelapu S. S., Tummala S., Kebriaei P., Wierda W., Gutierrez C., Locke F. L., Komanduri K. V., Lin Y., Jain N., Daver N., Westin J., Gulbis A. M., Loghin M. E., de Groot J. F., Adkins S., Davis S. E., Rezvani K., Hwu P., Shpall E. J. Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities // *Nat Rev Clin Oncol*. – 2018. – T. 15, № 1. – C. 47-62.
408. Negishi S., Girsch J. H., Siegler E. L., Bezerra E. D., Miyao K., Sakemura R. L. Treatment strategies for relapse after CAR T-cell therapy in B cell lymphoma // *Front Pediatr*. – 2023. – T. 11. – C. 1305657.
409. Viaud S., Ma J. S. Y., Hardy I. R., Hampton E. N., Benish B., Sherwood L., Nunez V., Ackerman C. J., Khialeeva E., Weglarz M., Lee S. C., Woods A. K., Young T. S. Switchable control over in vivo CAR T expansion, B cell depletion, and induction of memory // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2018. – T. 115, № 46. – C. E10898-E10906.