

На правах рукописи



Волков Дмитрий Васильевич

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

1.5.3 Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2024

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

Научный руководитель:

Степанов Алексей Вячеславович, кандидат биологических наук

Официальные оппоненты:

Тиллиб Сергей Владимирович, д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярных биотехнологий, ФГБУН Института биологии гена Российской академии наук;

Судариков Андрей Борисович, д.б.н., заведующий отделом молекулярной генетики, заведующий лабораторией молекулярной гематологии ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства.

Защита состоится « 4 » декабря 2024 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при ГНЦ ИБХ РАН по адресу: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.

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

Автореферат разослан « ___ » _____ 2024 года.

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

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Современные методы лечения онкогематологических заболеваний все чаще основаны на использовании иммунотерапевтических препаратов, которые являются альтернативой или применяются совместно с традиционными методами онкотерапии – химио- и радиотерапией. Стремительно развивающимся направлением иммунотерапии является применение Т клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами (CAR T). Химерные антигенные рецепторы (CAR) распознают антигены опухолевых клеток независимо от молекул главного комплекса гистосовместимости, что позволяет комбинировать антитело-опосредованное специфическое таргетирование поверхностных маркеров раковых клеток и цитотоксичность Т лимфоцитов. Более безопасная альтернатива CAR T клеткам – модифицированные CAR натуральные киллеры (NK). Так, CAR NK клетки практически не вызывают синдром выброса цитокинов (CRS) и реакцию трансплантат против хозяина (РТПХ), имеют широкий арсенал независимых от CAR механизмов уничтожения опухолевых клеток.

При разработке иммунотерапии первостепенной задачей является выбор ассоциированного с опухолью антигена, который не представлен в остальных тканях организма, для преодоления внеопухолевой антиген-опосредованной токсичности. Для онкогематологических заболеваний уникальным антигеном является общий лейкоцитарный антиген CD45, который экспрессируется на большей части клеток крови, включая злокачественные. Такие свойства делают CD45 уникальной мишенью для таргетной терапии, особенно при кондиционировании (освобождении от собственных клеток костного мозга (КМ)) пациентов перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Традиционно используемые для кондиционирования химио- или радиотерапия, высокотоксичные для клеток крови и КМ, провоцируют острые повреждения органов и связаны с пожизненным риском вторичного опухолеобразования. Более того, пациенты с нарушениями систем репарации ДНК (синдром Ниймеген, анемия Фанкони и т.п.) не могут получить такую терапию. Более специфичные и безопасные иммунотерапевтические методы кондиционирования основаны на таргетировании маркеров клеток крови. Нацеленные на CD45 препараты показали возможность элиминации гемопоэтических клеток. Однако для полноценной элиминации агрессивных злокачественных клеток, обладающих лекарственной устойчивостью, необходимы

агенты на основе иммунных клеток, способные более эффективно уничтожать опухолевые клетки. В этой связи, актуальной научно-исследовательской задачей является создание CAR T клеток и CAR NK клеток специфичных к CD45 и способных к эффективной элиминации клеток крови человека, включая злокачественные.

К сожалению, несмотря на впечатляющие клинические результаты, существует ряд нерешенных проблем в использовании геномодифицированных эффекторных клеток иммунной системы. Так, в настоящее время, стандартом является использование аутологичных T лимфоцитов пациента для наработки CAR T клеток. Функциональное состояние аутологичных T лимфоцитов зависит от предыдущего лечения пациентов, которое часто включает препараты первой линии терапии – химио- или радиотерапевтические агенты, которые высокотоксичны для активно делящихся клеток, в том числе и T лимфоцитов. Истощенные и нефункциональные аутологичные T лимфоциты приведут к неэффективности лечения аутологичными CAR T клетками. Использование здоровых донорских T лимфоцитов для производства CAR T клеток может решить данную проблему. Однако, применение аллогенных T лимфоцитов для получения CAR T клеток ограничено риском развития РТПХ, особенно при использовании гаплоидентичных (частично совместимых родственных) доноров. Для снижения этого риска разрабатываются подходы на уровне инжиниринга рецепторного аппарата T лимфоцитов и модификации субпопуляционного состава трансплантата и финального клеточного продукта. Ранее показали, что аллогенные T клетки памяти, негативные по маркеру CD45RA, можно использовать для инфузии донорских лимфоцитов с целью восстановления противовирусного иммунитета после ТГСК. При этом риск развития РТПХ минимален. T клетки памяти подходят для получения CAR Tm клеток. Последние эквивалентны по эффективности элиминации опухолей обычным CAR T клеткам *in vivo*, а в случае аллогенного применения не вызывают РТПХ. В этой связи аллогенные CAR Tm клетки, полученные из CD45RA-негативных T клеток памяти гаплоидентичных доноров, теоретически могут быть использованы в случае пациентов, прошедших ряд процедур химиотерапии и облучения, и как компонент трансплантата, способный к элиминации опухолей, для снижения риска развития рецидива лейкоза после ТГСК. Безусловно необходимо клиническое подтверждение данной гипотезы. Исследование эффективности CAR Tm клеточной терапии на пациентах и детальное сравнение CAR Tm клеток и классических CAR T клеток *in vitro* и *ex vivo*, являются крайне актуальными.

Цель работы и поставленные задачи

Цель – разработка и анализ новых иммунотерапевтических агентов и подходов, основанных на свойствах общего лейкоцитарного антигена CD45 для терапии онкогематологических заболеваний и кондиционирования перед трансплантацией костного мозга.

Задачи:

1. Получение нокаутных по CD45 CAR45 Т и CAR45 NK клеток для таргетирования пан-лейкоцитарного антигена CD45;
2. Функциональная оценка нокаутных по CD45 CAR45 Т клеток и CAR45 NK клеток *in vitro*;
3. Оценка потенциала нокаутных по CD45 CAR45 Т клеток к элиминации CD45-позитивных клеток человека *in vivo*;
4. Исследование терапевтического потенциала CD45RA-негативных CAR19 Т клеток, произведенных из Т клеток памяти (CAR19 Tm) на пациентах;
5. Сравнительный *in vitro* и *ex vivo* анализ CAR19 Tm клеток и CAR19 Т клеток.

Научная новизна и практическая значимость работы

С помощью геномного редактирования гена CD45 получены устойчивые к аутоксичности CAR45 Т клетки и CAR45 NK клетки нокаутные по CD45 (CD45^Δ), способные элиминировать CD45-позитивные клетки крови человека *in vitro*. Показано, что CD45^Δ CAR45 Т клетки эффективно элиминируют человеческие CD45-позитивные опухоли и трансплантат моноклеарных клеток периферической крови человека *in vivo*. В результате, CD45^Δ CAR45 Т клетки являются тканеспецифичной и менее токсичной альтернативой существующим препаратам для кондиционирования и лизиса гемопоэтических опухолей перед ТГСК.

Продемонстрирована эффективная элиминация В клеточной опухоли у пациентов аллогенными CAR19 Т клетками с фенотипом Т клеток памяти (CAR 19 Tm) в отсутствие тяжелой РТПХ. Детальное сравнительное исследование стандартных CAR19 Т и CAR19 Tm клеточных препаратов выявило различия в их фенотипе, параметрах истощения, транскриптомном профиле и длительности цитотоксической активности, которые необходимо учитывать для успешного клинического применения CAR19 Tm клеток.

Методы исследования

В работе использованы современные методы геномной и клеточной инженерии, обеспечивающие достоверные воспроизводимые

результаты, включая клонирование плазмид, получение, модификацию и культивацию клеточных линий и первичных клеток, различные методы анализа экспрессии характерных маркеров, измерения клеточной активности. Методы работы с животными, включая создание ксенографтных моделей и прижизненную детекцию развития опухолей. Статистический анализ выполнен с помощью GraphPad Prism 9.0. На рисунках обозначены средние значения \pm стандартное отклонение. Все эксперименты выполнены не менее чем в трех повторах, если не указано иное. Результаты обработаны с помощью двустороннего непарного *t*-критерия Стьюдента, кривые выживаемости построены методом Каплана-Майера. Статистически значимая разница при $p < 0.05$. Обозначения: ns – $p \geq 0.05$, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, **** – $p < 0.0001$.

Положения, выносимые на защиту

1. CD45^A CAR45 Т клетки и CD45^A CAR45 NK клетки лизируют CD45-позитивные клетки человека, включая злокачественные, *in vitro*;
2. CD45^A CAR45 Т клетки элиминируют CD45-позитивные клетки человека, включая злокачественные, *in vivo*;
3. Впервые показано, что аллогенные CAR19 Т клетки с фенотипом клеток памяти эффективно элиминируют В клеточную опухоль и не вызывают РТПХ тяжелой степени у пациентов;
4. CAR19 Т клетки с фенотипом клеток памяти быстрее теряют функциональную активность и отличаются по ряду характеристик (фенотип, профиль истощения) от CAR19 Т клеток.

Степень достоверности результатов

Достоверность и воспроизводимость полученных результатов обеспечена набором методов на основе современных исследований в смежной тематике, указанными материалами и статистической обработкой.

Апробация работы

Основные результаты работы опубликованы в 3-х статьях в рецензируемых журналах и представлены автором на 3-х конференциях.

Структура и объем диссертации

Текст диссертации изложен на 135 страницах, иллюстрирован 53-мя рисунками, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, сокращений, списка литературы, включающего 173 источника, и приложений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Получение, оценка функциональности и терапевтического потенциала CD45^A CAR45 T клеток и CD45^A CAR45 NK клеток

Создание CD45^A T клеток

Чтобы в дальнейшем создать устойчивые к аутоксичности CAR T клетки, специфичные к CD45, в T лимфоцитах нокаутировали ген *PTPRC*, кодирующий CD45. Для этого использовали технологию геномного редактирования CRISPR/Cas9. Механизм действия Cas9 заключается в том, что в ДНК вносят хаотично заполняющийся при репарации двуцепочечный разрыв и сдвигают, тем самым, рамку считывания. Это приводит к появлению стоп-кодонов в транскрибируемой мРНК, которые нарушают трансляцию функционального белка. Для нацеливания Cas9 использовали гидовую РНК к экзону 1 гена *PTPRC* – GGGTTTAAGCCACAAATACA (gRNA2) с наибольшей эффективностью нокаута, которую оценивали методом проточной цитофлуориметрии после окрашивания модифицированных T лимфоцитов флуоресцентно мечеными моноклональными антителами (фМкАТ) к CD45 (Рисунок 1А).

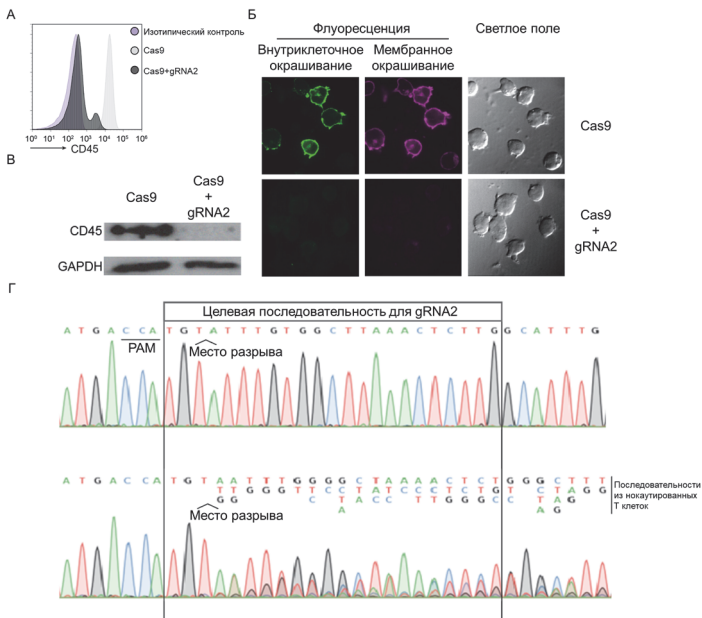


Рисунок 1 – Анализ уровня CD45 на поверхности T клеток и общего уровня CD45 в клетках после нокаута гена *PTPRC*, а также изменений в геномной ДНК с помощью

секвенирования; А – проточная цитофлуориметрия, Б – конфокальная микроскопия; В – вестерн-блоттинг; Г – секвенирование по Сэнгеру, PAM (protospacer adjacent motif) – последовательность, необходимая для работы CRISPR/Cas9, которая находится на 2 цепи ДНК (на рисунке обозначена комплементарная PAM последовательность)

Доля нокаутированных по CD45 клеток зависит от донора Т клеток, но в среднем эффективность нокаута не менее 85%, при этом Т клетки сохраняют высокую жизнеспособность. Эффективность нокаута гена *PTPRC* дополнительно анализировали методами конфокальной микроскопии, вестерн-блоттинга и секвенирования по Сэнгеру (Рисунок 1Б, В, Г), и подтвердили отсутствие CD45 и изменение последовательности гена *PTPRC* в отредактированных лимфоцитах.

С помощью секвенирования следующего поколения фрагментов генома Т клеток с наибольшей вероятностью неспецифической активности Cas9, обнаружили изменения последовательности в гене белка тромбоспондина *THSD4*, который, тем не менее, не вырабатывается в иммунных клетках.

Таким образом, разработанная методика позволяет получать жизнеспособные CD45^Δ Т клетки с высоким процентом нокаута, практически не затрагивая при этом другие области генома.

Редактирование гена CD45 не приводит к нарушению функций Т клеток

Литературные данные не позволили однозначно утверждать, что функция Т лимфоцитов не пострадает при удалении CD45, поэтому необходимо было экспериментально оценить влияние нокаута на активность Т клеток *in vitro*. Для этого Т лимфоциты инкубировали с CD19-позитивными клетками Ramos ffLuc/GFP в присутствии биспецифического активатора Т клеток (BiTE, bispecific T cell engager) блинатумомаба (Рисунок 2А).

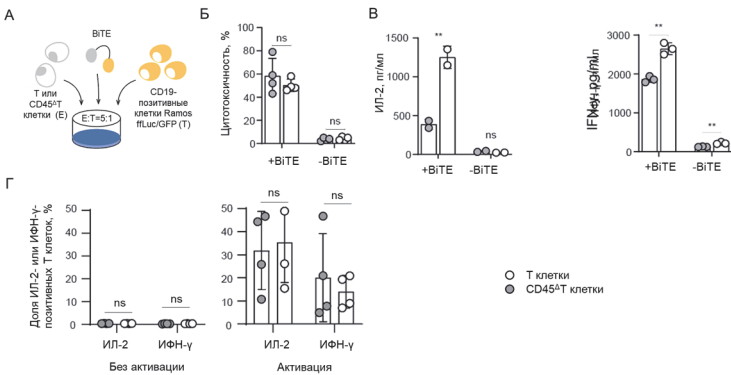


Рисунок 2 – Сравнительный анализ активности CD45^A Т клеток и обычных Т лимфоцитов, опосредованной ТКР (А, Б, В) и опосредованной внутриклеточными участниками сигнальных каскадов, минуя ТКР (Г) методами проточной цитофлуориметрии и ИФА; А – общая схема эксперимента для Б, В; Б – цитотоксичность; В – продукция провоспалительных цитокинов; ВiТЕ – блинатумомаб; +/-ВiТЕ – добавление/отсутствие ВiТЕ; ТКР – Т клеточный рецептор; звездочки показывают значимые отличия только в зависимой от ТКР секреции провоспалительных цитокинов между CD45^A Т клетками и обычными Т лимфоцитами

Блинатумомаб связывает CD19 на опухолевой клетке и CD3ε на Т лимфоцитах, активируя Т клеточный рецептор (ТКР). Уровень цитотоксичности (Рисунок 2Б) CD45^A Т клеток и интенсивность секреции ими провоспалительных цитокинов (интерлейкина 2 (ИЛ-2) и гамма-интерферона (ИФН-γ)) (Рисунок 2В) сравнили с показателями ненокаутированных Т лимфоцитов. По убыванию количества GFP-позитивных таргетных клеток определяли цитотоксичность методом проточной цитофлуориметрии. Уровень выделяемых провоспалительных цитокинов детектировали с помощью иммуоферментного анализа (ИФА). Как видно из результатов, цитотоксическая активность сохраняется неизменной независимо от наличия CD45, выделение ИЛ-2 и ИФН-γ в отсутствие CD45 уменьшается.

Кроме того, Т клетки инкубировали со смесью иономицина и форболового эфира, которые активируют пути транскрипционных факторов NFAT и NFκB, не требуя участия ТКР (Рисунок 2Г). В стимулированных клетках оценивали продукцию провоспалительных цитокинов с помощью внутриклеточного окрашивания фМкАТ к ИЛ-2 и ИФН-γ и последующим анализом методом проточной цитофлуориметрии. Как видно по результатам анализа, активация путей внутриклеточной сигнализации Т лимфоцитов в обход ТКР с помощью низкомолекулярных агентов приводит к одинаковой продукции провоспалительных цитокинов обычными и CD45^A Т клетками. Это значит, что CD45 влияет только на первоначальные стадии сигналинга от ТКР, что соотносится с данными литературы, а в остальном механизмы ответа на стимуляцию у нокаутных по CD45 Т клеток не нарушены.

Нокаут гена CD45 не нарушает цитотоксическую функцию CD45^A CAR19 Т клеток *in vitro*

Для оценки того, как удаление CD45 влияет на CAR Т клетки, в качестве мишени был выбран антиген CD19. Генетическая конструкция CAR19 для таргетирования CD19 и модификации Т лимфоцитов была получена ранее в лаборатории. Т лимфоциты выделяли из периферической крови здоровых доноров, активировали,

трансдуцировали лентивирусами, несущими ген CAR19, и в случае CD45^Δ CAR19 Т клеток нокаутировали ген *PTPRC*. Через несколько дней после нокаута нетрансдуцированные (Mock) Т лимфоциты и CAR Т клетки окрашивали фМкАТ к CD45 и CAR19 и анализировали результат методом проточной цитофлуориметрии (Рисунок 3).

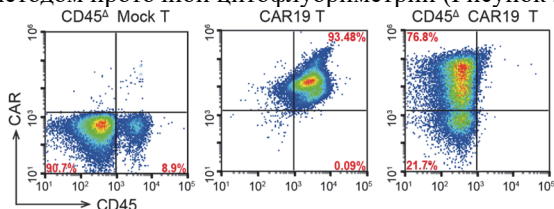


Рисунок 3 – Окрашивание Mock Т клеток и CAR Т клеток фМкАТ к CD45 и CAR19 на 7 день эксперимента и анализ экспрессии обозначенных маркеров методом проточной цитофлуориметрии

Как видно из результатов окрашивания, разработанный протокол позволяет получать CD45^Δ CAR19 Т клетки. Анализ экспансии же показал, что CD45^Δ CAR19 Т клетки не отличаются от CAR19 Т клеток, и их можно успешно наработать *ex vivo*.

Далее сравнили цитотоксичность (Рисунок 4А, Б) и продукцию провоспалительных цитокинов (ИЛ-2 и ИФН-γ) (Рисунок 4В, Г) CAR19 Т клеток и CD45^Δ CAR19 Т клеток в присутствии CD19-позитивных опухолевых клеток линии Nalm-6 и Jeko-1, модифицированных ffLuc/GFP для детекции GFP-позитивных событий методом проточной цитофлуориметрии в анализе цитотоксичности.

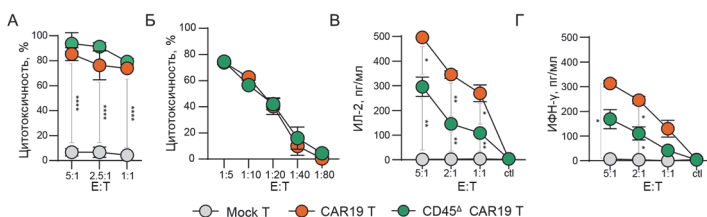


Рисунок 4 – Сравнительный анализ активности CD45^Δ CAR19 Т клеток и CAR19 Т клеток в присутствии CD19-позитивных клеток Jeko-1 и Nalm-6 методами проточной цитофлуориметрии и ИФА; А – цитотоксичность в отношении Jeko-1, Б – цитотоксичность в отношении Nalm-6, В – продукция ИЛ-2 в присутствии Jeko-1, Г – продукция ИФН-γ в присутствии Jeko-1; ctl – контрольные точки без целевых клеток; звездочки показывают значимые отличия в цитотоксичности между контрольными Mock Т клетками и эффективно лизирующими целевые клетки CD45^Δ CAR19 Т клетками и CAR19 Т клетками, а так же значимые отличия в секретиции провоспалительных цитокинов между CD45^Δ CAR19 Т клетками и CAR19 Т клетками

Инкубация с Jeko-1 и последующий подсчет целевых клеток показывает, что цитотоксичность CD45^Δ CAR19 Т клеток сохраняется

на уровне CAR19 Т клеток. Результаты ИФА секреции провоспалительных цитокинов показывают, что CD45^Δ CAR19 Т клетки производят меньше ИЛ-2 и ИФН-γ.

Нокаут гена CD45 не нарушает цитотоксическую функцию CD45^Δ CAR19 Т клеток *in vivo*

В *in vivo* эксперименте анализировали способность CD45^Δ CAR19 Т клеток в сравнении с обычными CAR19 Т клетками элиминировать ксенографты опухолей человека (Рисунок 5).

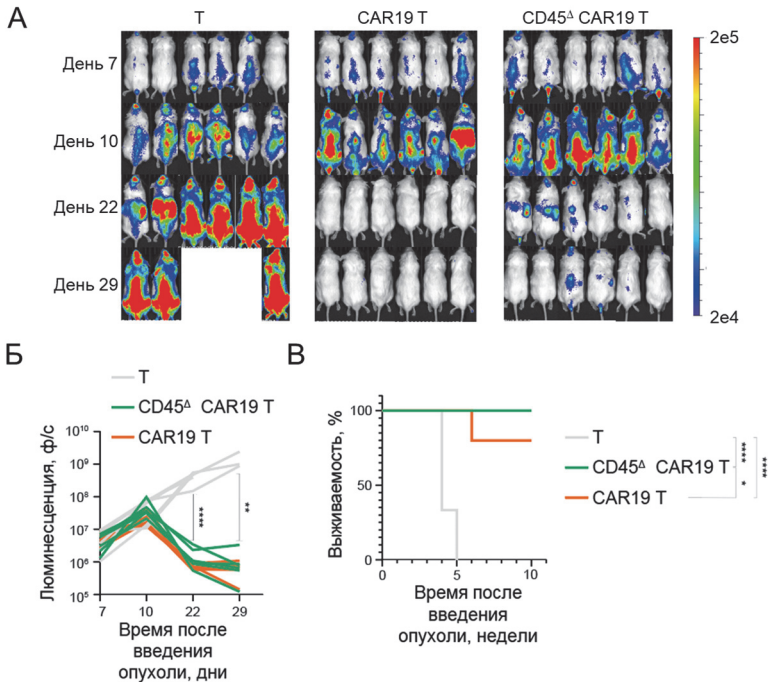


Рисунок 5 – Сравнительный анализ элиминации CD19-позитивной опухоли CD45^Δ CAR19 Т клетками и CAR19 Т клетками *in vivo*; А – визуализация развития опухоли; Б – динамика люминесцентного сигнала в течение эксперимента; В – выживаемость мышей по группам; звездочки показывают значимые отличия в динамике опухолевого сигнала и выживаемости мышей между группами животных с терапией CAR Т клетками (при этом лечение CD45^Δ CAR19 Т клетками и CAR19 Т клетками дает сходный результат по эффективной элиминации опухолей) и терапией контрольными Mock Т клетками

CD19-позитивные клетки Nalm-6 ffLuc/GFP внутривенно прививали иммунодефицитным мышам линии *NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{em1}Smoc* (NCG). Через неделю животных случайным образом делили на группы и

внутривенно вводили Mock T клетки, CAR19 T клетки, либо CD45^Δ CAR19 T клетки. Динамику развития опухоли визуализировали методом прижизненной детекции люминесцентного сигнала (Рисунок 5А, Б), также наблюдали за выживаемостью мышей в долговременном периоде (Рисунок 5В). Полученные результаты показывают, что CD45^Δ CAR19 T клетки эффективно элиминируют В клеточные опухоли и способствуют лучшей выживаемости животных.

Создание CD45^Δ CAR45 T клеток

В литературе описан клон МкАТ ВС8 ко всем известным изоформам человеческого CD45. Для создания ВС8-CAR 3 поколения (CAR45), включающего ко-стимулирующие домены из CD28 и CD134, использовали одноцепочечный варибельный фрагмент ВС8.

При получении CD45^Δ CAR45 T клеток стало понятно, что они стремительно теряют жизнеспособность. CD45 в большом количестве присутствует на поверхности T клеток и, вероятно, остаточное количество CD45 на мембране клеток достаточно для взаимной активации и цитотоксичности. Было решено модифицировать разработанный для CD45^Δ CAR19 T клеток протокол с помощью добавления обратимого ингибитора тирозинных киназ – дазатиниба, который уже был использован для наработки CAR T лимфоцитов, специфичных к T клеточному маркеру CD7. В результате анализа ряда концентраций дазатиниба установили, что при добавлении 50нМ CD45^Δ CAR45 T клетки успешно пролиферируют и сохраняют жизнеспособность (Рисунок 6А).

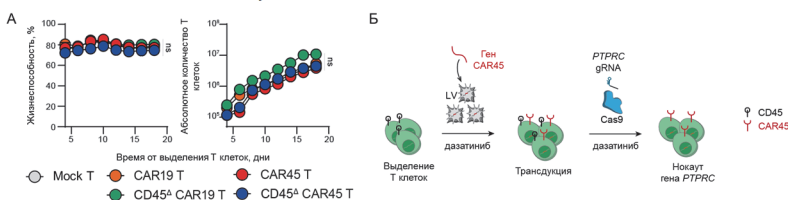


Рисунок 6 – Сравнительный анализ жизнеспособности и динамики количества CD45^Δ CAR45 T клеток, CAR45 T клеток и контрольных нокаутных и ненокаутных по CD45 CAR19 T клеток и Mock T клеток в присутствии 50 нМ дазатиниба (А) и схема получения CD45^Δ CAR45 T клеток (Б); LV – лентивирусы

Согласно итоговому протоколу (Рисунок 6Б), начиная с трансдукции, на протяжении всего процесса экспансии в культуральную среду добавляли дазатиниб. Перед постановкой экспериментов эффекторные клетки помещали в среду без дазатиниба.

С помощью анализа окрашивания T лимфоцитов фМКАТ к CD45 и CAR45 методом проточной цитофлуориметрии было

установлено, что процент CAR-позитивных и CD45-негативных Т клеток увеличивается со временем (Рисунок 7А). Концентрация дазатиноба 50 нМ создает такие условия экспансии, которые позволяют CD45^Δ CAR45 Т клеткам продержаться до момента полноценного исчезновения CD45 с поверхности нокаутированных клеток и лизировать оставшуюся после нокаута популяцию CD45-позитивных Т лимфоцитов.

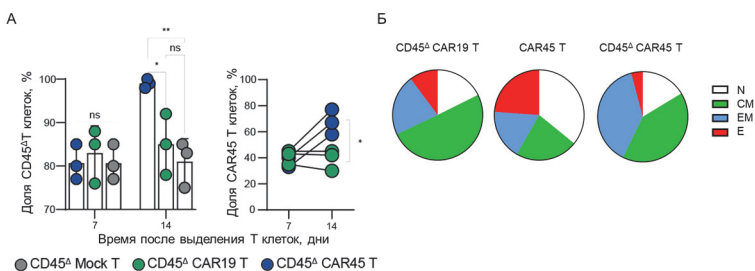


Рисунок 7 – Сравнительный анализ динамики процентного содержания CAR-позитивной и CD45-негативной Т клеточных популяций в процессе экспансии (окрашивали клетки фМкАТ к соответствующим маркерам и анализировали методом проточной цитофлуориметрии) (А) и сравнительный анализ фенотипа CD45^Δ CAR45 Т клеток, CAR45 Т клеток и CD45^Δ CAR19 Т клеток на 14 день экспансии (Б); популяции Т лимфоцитов: 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⁺); звездочки показывают значимые отличия в процентном содержании популяций между CD45^Δ CAR45 Т клетками и контрольными CD45^Δ CAR19 Т клетками

Фенотипически CD45^Δ CAR45 Т клетки в основном представляют собой Т лимфоциты центральной и эффекторной памяти (Рисунок 7Б). Для определения фенотипа клетки окрашивали фМкАТ к CD62L, CD27 и CD95 и анализировали результат методом проточной цитофлуориметрии. Данные показывают, что экспансия CD45^Δ CAR45 Т клеток делает их более дифференцированными в сравнении с CD45^Δ CAR19 Т (судя по преобладанию T_{EM} популяции). При этом CD45^Δ CAR45 Т клетки выгодно и ожидаемо отличаются от CAR45 Т клеток, значительная доля которых – это терминально дифференцированные T_E лимфоциты.

CD45^Δ CAR45 Т клетки эффективнее CAR45 Т клеток лизируют CD45-позитивные клетки крови человека *in vitro*

Для того, чтобы позднее протестировать активность CD45^Δ CAR45 Т клеток на панели таргетных клеток мы охарактеризовали ряд линий опухолевых клеток, относящихся к разным онкогематологическим патологиям, по наличию маркеров CD45 и CD19

с помощью специфичных фМкАТ методом проточной цитофлуориметрии (Рисунок 8А). Такое разнообразие таргетных клеток отражает идею терапии широкого спектра онкогематологических заболеваний, а включение CD45-негативных таргетов является мерой специфичности полученных CD45^Δ CAR45 Т клеток. Таргетные клетки модифицировали fLuc/GFP, чтобы анализировать цитотоксичность CAR Т методом проточной цитофлуориметрии.

Из результатов количественного анализа цитотоксичности (Рисунок 8Б) видно, что CD45^Δ CAR45 Т клетки лизируют более широкий спектр таргетных клеток по сравнению с CAR19 Т клетками. Также CD45^Δ CAR45 Т клетки эффективнее, чем CAR45 Т клетки, лизируют CD45-позитивные таргетные клетки.

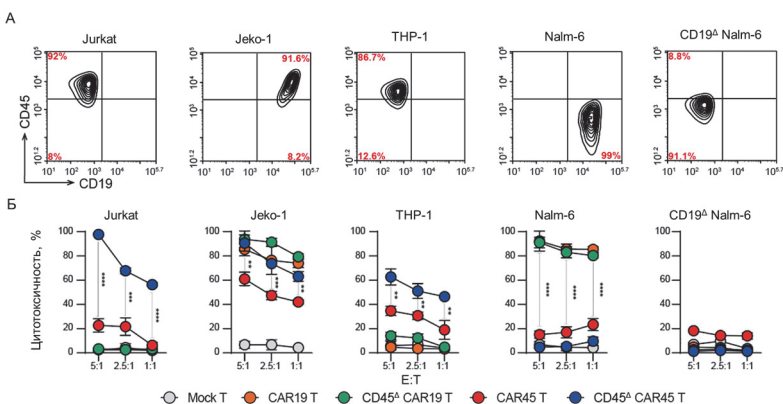


Рисунок 8 – Окрашивание таргетных опухолевых клеток фМкАТ к CD45 и CD19 и анализ экспрессии этих маркеров методом проточной цитофлуориметрии; CD19^Δ – клетки, нокаутные по гену, кодирующему CD19 (А) и сравнительный анализ цитотоксичности CD45^Δ CAR45 Т клеток, CAR45 Т клеток и контрольных нокаутных и ненокаутных по CD45 CAR19 Т клеток и Mock Т клеток в отношении таргетных клеток (Б); CD19^Δ – клетки, нокаутные по гену, кодирующему CD19; звездочки показывают значимые отличия в уровне цитотоксичности CD45^Δ CAR45 Т клеток и CAR45 Т клеток в случае CD45-позитивных таргетных клеток, а также, в случае CD19-позитивных и CD45-негативных клеток Nalm-6, между CAR45 Т клетками и CAR19 Т клетками

Для оценки цитотоксичности в отношении незлокачественных гемопоэтических клеток CD45^Δ CAR45 Т клетки инкубировали с аутологичными таргетными клетками (Рисунок 9А): Т клетками (Рисунок 9Б), РВМС (Рисунок 9В) и клетками костного мозга (Рисунок 9Г), более релевантной целью для элиминации. Полученные результаты убедительно показывают, что CD45^Δ CAR45 Т клетки эффективно лизируют незлокачественные CD45-позитивные клетки крови человека.

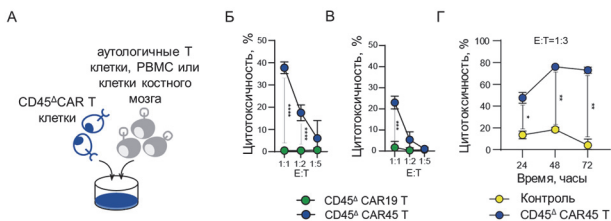


Рисунок 9 – Сравнительный* анализ цитотоксичности CD45^Δ CAR45 T клеток и CD45^Δ CAR19 T клеток в отношении аутологичных гемопоэтических клеток; А – схема эксперимента, Б – цитотоксичность T клеток; В – цитотоксичность PBMC, Г – цитотоксичность клеток костного мозга (* – в случае клеток КМ (Г) в контрольные лунки не добавляли эффекторных клетки); звездочки обозначают значимые различия между CD45^Δ CAR45 T клетками и CD45^Δ CAR19 T клетками, которые особенно выражены при наибольшем соотношении эффекторных (Е) и таргетных (Т) клеток, а также значимые отличия в наличии лизиса клеток КМ при добавлении CD45^Δ CAR45 T клеток

CD45^Δ CAR45 NK клетки лизируют нетрансформированные CD45-позитивные гемопоэтические клетки человека *in vitro*

Наряду с уже обозначенными преимуществами, CAR NK клетки обладают более короткой персистенцией по сравнению с CAR T, что делает их пригодными для кратковременной иммунотерапии, которая требуется при кондиционировании пациентов. Разработанный на предыдущих этапах работы протокол оптимизировали для получения устойчивых к аутоксичности CD45^Δ CAR45 NK клеток (Рисунок 10А).

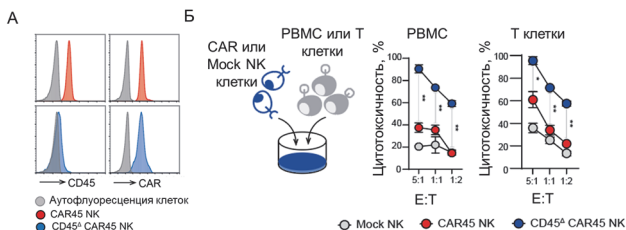


Рисунок 10 – Получение и сравнительный анализ цитотоксичности CD45^Δ CAR45 NK клеток и CAR45 NK клеток в отношении гемопоэтических клеток человека, окрашенных с помощью CFSE (осуществляли методом проточной цитофлуориметрии); А - Окраска NK клеток после трансдукции и нокаута фМкАТ к CD45 и CAR45 и анализ экспрессии этих маркеров методом проточной цитофлуориметрии, Б – цитотоксичность CD45^Δ CAR45 NK клеток в отношении гемопоэтических клеток человека

Инкубация с CD45-позитивными клетками крови человека показала, что CD45^Δ CAR45 NK клетки активно лизируют T клетки и PBMC (Рисунок 10Б).

Создание животных моделей для CD45^Δ CAR45 NK клеток значительно сложнее из-за особенностей NK клеток, которые требуют в

том числе непрерывной цитокиновой поддержки *in vivo*. Поэтому было решено сосредоточиться именно на CD45^Δ CAR45 Т клетках в экспериментах с животными.

CD45^Δ CAR45-Т-клетки эффективнее CAR45 Т клеток элиминируют CD45-позитивные гемопозитические клетки человека *in vivo*

Мышам линии NCG внутривенно подсаживали клетки THP-1 ffLuc/GFP, которые являются классической моделью острого миелоидного лейкоза. Через три дня мышей делили на группы и внутривенно вводили Mock Т клетки, CAR45 Т клетки или CD45^Δ CAR45 Т клетки. Визуализировали развитие опухоли методом прижизненной детекции люминесцентного сигнала (Рисунок 11А, Б), также наблюдали за выживаемостью мышей в долговременном периоде (Рисунок 11В).

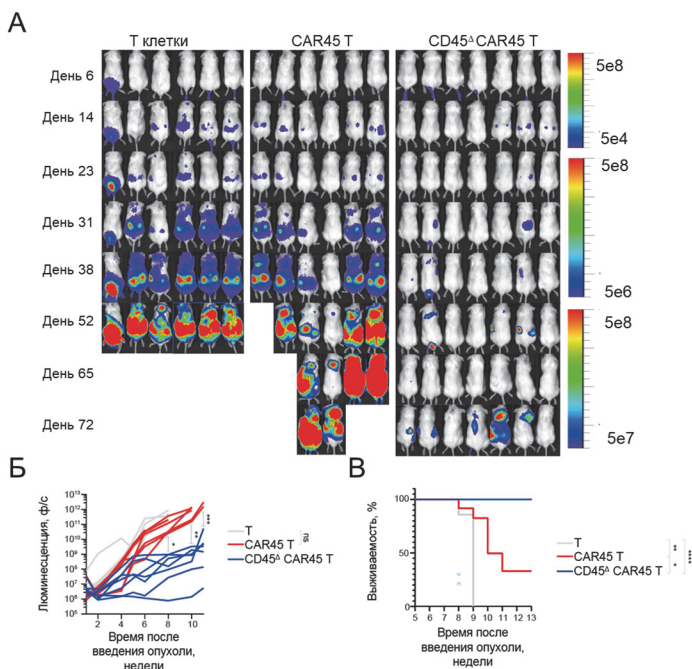


Рисунок 11 – Сравнительный анализ элиминации CD45-позитивной опухоли CD45^Δ CAR45 Т клетками и CAR45 Т клетками *in vivo*; А – визуализация развития опухоли; Б – динамика люминесценции в течение эксперимента; В – график выживаемости мышей по группам; звездочки показывают значимые отличия в динамике опухолевого сигнала и выживаемости мышей между группами животных с разной терапией, главным образом между получающими CD45^Δ CAR45 Т клетки и CAR45 Т клетки

ТНР-1 образуют локальные очаги с микроокружением, которое препятствует терапевтическому действию CAR Т клеток. Но результаты показывают, что CD45^Δ CAR45 Т клетки эффективно лизируют CD45-позитивную опухоль и способствуют лучшей выживаемости лабораторных животных. При этом терапевтический эффект ненокаутных CAR45 Т лимфоцитов ожидаемо хуже из-за аутоксичности.

Для оценки потенциала к элиминации незлокачественных CD45-позитивных клеток крови человека наиболее релевантной животной моделью являются гуманизированные с помощью CD34-позитивных клеток иммунодефицитные мыши с полностью человеческим гемопоэзом. Однако такие модели довольно сложно реализуемы, долго производятся и высока вероятность неудачи при их получении. Поэтому мы использовали более воспроизводимую альтернативу. Мышам линии NCG внутривенно подсаживали аутологичные для CAR Т клеток человеческие PBMC. Через 4 недели определяли химеризм (долю человеческих клеток среди всех CD45-позитивных клеток в крови мышей). Затем мышей делили на группы и внутривенно вводили CD45^Δ Mock Т клетки (группа I), CD45^Δ CAR19 Т клетки (группа II) либо CD45^Δ CAR45 Т клетки (группа III). Терапевтический эффект в виде снижения химеризма анализировали методом проточной цитофлуориметрии после окрашивания фМКАТ к CD45 человека (Рисунок 12А, Б).

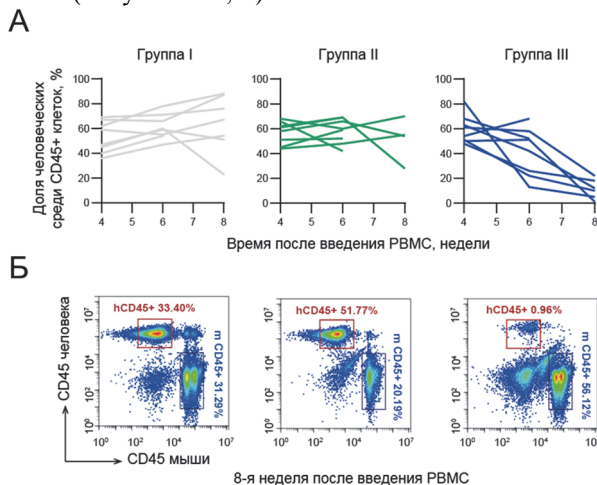


Рисунок 12 – Сравнительный анализ элиминации аутологичных PBMC CD45^Δ CAR45 Т клетками и CD45^Δ CAR19 Т клетками *in vivo*; А – динамика химеризма (значения получены в результате анализа методом проточной цитофлуориметрии); Б – окраска крови

мышей фМкАТ к человеческому и мышинному CD45 на 8 неделю эксперимента и детекция CD45-позитивных и негативных популяций методом проточной цитофлуориметрии; hu-PBMC – человеческие PBMC; hCD45 – CD45-позитивные клетки человека; mCD45 – CD45-позитивные клетки мыши

Полученные результаты свидетельствуют о том, что CD45^Δ CAR45 T клетки эффективно элиминируют человеческие PBMC.

Проведенные доклинические эксперименты подтверждают терапевтическую эффективность полученных CD45^Δ CAR45 T клеток в отношении CD45-позитивных гемопоэтических клеток человека, в том числе злокачественных.

Для трансляции разработанного подхода в клинику необходимо использовать различные способы защиты пациента от долговременной персистенции CD45^Δ CAR45 T клеток либо после терапии, либо на этапе получения CAR T лимфоцитов. Например, можно проводить дополнительное кондиционирование пониженной интенсивности после введения CD45^Δ CAR45 T клеток. На этапе производства CAR T клеток можно модифицировать T лимфоциты дополнительными маркерами для индуцируемого лизиса; можно модифицировать T клетки с помощью мРНК, кодирующей CAR45, которая обеспечивает временную экспрессию рецептора и т.д.

Исследование терапевтического потенциала аллогенных CAR19 T клеток, произведенных из CD45RA-негативных T клеток памяти

История пациентов для терапии аллогенными CAR19 Tm клетками

5 пациентов Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева (НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева) с В-клеточным острым лимфобластным лейкозом перенесли ряд как традиционных методов лечения, так и иммунотерапевтических, включая терапию аутологичными CAR19 T клетками, терапию блинатумомабом и ТГСК (Таблица 1).

Таблица 1 – История пациентов, столкнувшихся с повторными релапсами

Пациент	Заболевание	Предыдущая иммунотерапия	Релапс В-ALL перед аллогенной терапией, % blasts в КМ
#1	В-ALL	CAR19 T, ТГСК	16
#2	В-ALL	блинатумомаб, CAR19 T, ТГСК	98
#3	В-ALL	CAR19 T, ТГСК	MRD+
#4	В-ALL	блинатумомаб, CAR19 T, ТГСК	MRD+
#5	В-ALL	блинатумомаб, ТГСК	95

MRD – минимальное остаточное заболевание; В-ALL - В клеточный острый лимфобластный лейкоз

К сожалению, эти пациенты столкнулись с повторными релапсами.

Ранее было показано, что инфузия T клеток памяти от гаплоидентичных доноров для восстановления противовирусного

иммунитета пациентов после ТГСК не вызывает тяжелой РТПХ. Было также продемонстрировано, что CAR T лимфоциты, полученные из аллогенных Т клеток памяти, не вызывают тяжелой РТПХ у животных, хотя элиминируют опухоли также эффективно, как и классические CAR T клетки. На этом основании было решено впервые провести экспериментальное исследование CAR19 Tm клеток в качестве терапии “последней надежды” для этих 5-и пациентов.

Полученные CAR19 Tm клетки отличаются по составу поверхностных маркеров от CAR19 Т клеток

CAR19 Tm лимфоциты перед введением пациентам были охарактеризованы по набору маркеров с помощью проточной цитофлуориметрии после окрашивания соответствующими фМкАТ (Рисунок 13). Как видно по результатам, в CAR19 Tm клетках превалирует содержание CD4⁺ Т лимфоцитов (Рисунок 13А). Разница в проценте трансдукции (Рисунок 13Б) обусловлена, вероятно, разными донорами. Большая часть CAR19 Tm клеток – это T_{EM} лимфоциты (Рисунок 13В), что означает более дифференцированную популяцию с меньшей склонностью к пролиферации по сравнению с T_{SCM}. Кроме того, CAR19 Tm клетки склонны экспрессировать некоторые маркеры истощения (LAG3 и TIGIT) (Рисунок 13Г).

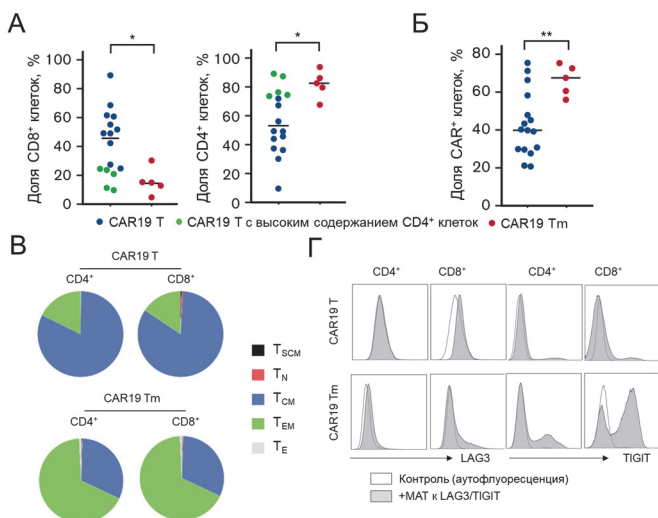


Рисунок 13 – Сравнительная характеристика CAR19 Tm клеток и CAR19 Т клеток перед введением пациенту; А – Соотношение CD8⁺ и CD4⁺ популяций Т лимфоцитов; Б – Доля CAR⁺ Т клеток; В – Фенотип CD8⁺ и CD4⁺ популяций; Г – Окрашивание фМкАТ к маркерам истощения LAG3 и TIGIT; данные получены с помощью

иммунофенотипирования; популяции Т лимфоцитов: T_{SCM} – клетки памяти с признаками стволовости, T_N – наивные, T_{CM} – центральной памяти, T_{EM} – эффекторной памяти, T_E – эффекторные, или терминально дифференцированные; звездочки обозначают значимую разницу в экспрессии CD4, CD8 и CAR19 между CAR19 Tm клетками и CAR19 T клетками

CAR19 Tm клетки эффективно элиминируют В клеточный острый лимфобластный лейкоз и не вызывают тяжелой РТПХ

Вся клиническая часть была выполнена на базе НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Показатель минимального остаточного заболевания (MRD) после терапии определял ее эффективность. Адоптивная CAR19 Tm клеточная терапия привела к положительному клиническому исходу в 80% случаев (Таблица 2). Среди пациентов не наблюдалось тяжелых (3 и 4 степени) побочных реакций, включая РТПХ (1 пациент с 1 степенью РТПХ).

Таблица 2 – Результаты лечения пациентов 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

На протяжении лечения анализировали кровь пациентов методом проточной цитофлуориметрии после окрашивания клеток фМкАТ к CD3 и CAR19 и следили за персистенцией CAR19⁺ Т лимфоцитов (Рисунок 14).

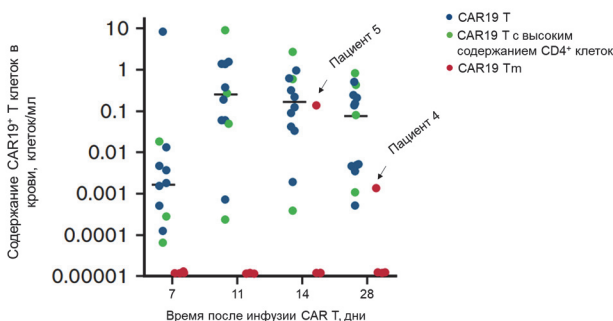


Рисунок 14 – Сравнительный анализ персистенции CAR19⁺ Т лимфоцитов в организме пациентов после терапии CAR19 Tm клетками и CAR19 T клетками (с помощью окрашивания фМкАТ к CD3 и CAR19 и последующей детекцией методом проточной цитофлуориметрии); каждая точка – отдельный пациент, при этом для ряда пациентов (#1-#4) присутствует результат терапии как CAR19 T клетками, так и CAR19 Tm клетками; стрелочками обозначены пациенты, у которых присутствовали CAR19 Tm клетки в крови в определенный момент после терапии

По результатам видно, что только у 20% пациентов в крови детектируются CAR19 Tm. Это отличается от полученных ранее данных после введения CAR19 T клеток, которые в той или иной степени присутствовали в крови у всех пациентов. Отличия вероятно связаны с разным популяционным составом CAR19 Tm клеток и CAR19 T клеток, который определяет в том числе поведение лимфоцитов *in vivo*.

Для более детального сравнения CAR19 Tm клеток и CAR19 T клеток и понимания природы их различий, мы провели ряд *in vitro* и *ex vivo* экспериментов.

CAR19 Tm клетки не уступают CAR19 T клеткам в реакциях активации и немедленной цитотоксичности, но быстрее теряют способность лизировать таргетные клетки при повторной инкубации с ними

Сначала сравнили способность CAR19 Tm клеток и CAR19 T клеток к цитолизу CD19-позитивных опухолевых клеток. В качестве таргетных клеток использовали модифицированные Jeko-1, которые продуцируют красный флуоресцентный белок mKate2. В эксперименте ежечасно следили за падением флуоресценции от таргетных клеток Jeko-1 благодаря их лизису в течение двух дней инкубации (Рисунок 15А).

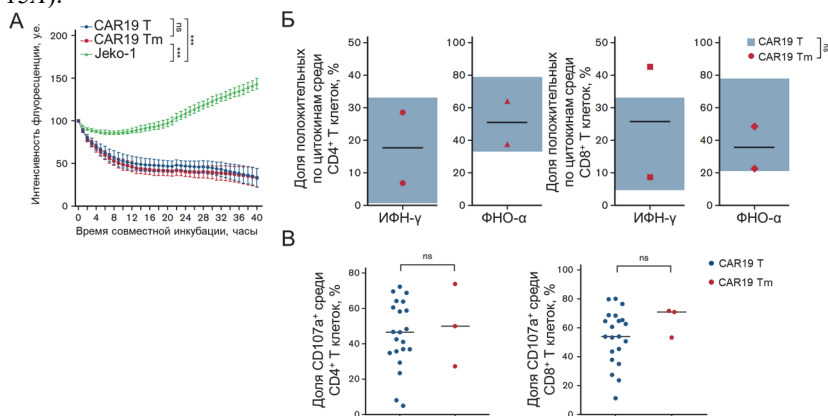


Рисунок 15 – Сравнительный анализ немедленной цитотоксичности CAR19 Tm клеток и CAR19 T клеток методом, основанным на детекции падения флуоресцентного сигнала от таргетных клеток в течение промежутка времени (А) и сравнительный анализ активации CAR19 Tm клеток и CAR19 T клеток к фактору некроза опухоли альфа после окрашивания фМкАТ к провоспалительным цитокинам и маркерам дегрануляции методом проточной цитофлуориметрии (Б, Б'); Б – продукция провоспалительных цитокинов; Б' – дегрануляция; ФНО-α – фактор некроза опухоли альфа; CD107a – маркер цитолитических гранул; звездочки обозначают значимую разницу в лизисе Jeko-1 между контрольными Mock T клетками и эквивалентными друг другу CAR19 Tm клетками и CAR19 T клетками

В то же время сравнили продукцию провоспалительных цитокинов (Рисунок 15Б) и цитолитических гранул эффекторными клетками (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**Рисунок 15Б) в присутствии Jeko-1 методом проточной цитофлуориметрии после окрашивания клеток фМкАТ к соответствующим маркерам активации.

Как видно по результатам, лизис Jeko-1 в краткосрочном периоде и уровень активации у CAR19 Tm клеток и CAR19 Т клеток эквивалентен.

Для оценки динамики уровня цитотоксичности в долговременном периоде провели стресс-тест, в котором к эффекторным (Е) CAR19 Tm клеткам или CAR19 Т клеткам каждые три дня добавляли свежие таргетные (Т) клетки Jeko-1 в соотношении Е:Т=1:5 и анализировали цитолиз методом проточной цитофлуориметрии по снижению сигнала от флуоресцирующих Jeko-1 (Рисунок 16). Результаты показывают, что CAR19 Tm лимфоциты быстрее теряют способность к цитолизу опухолевых клеток, вероятно, из-за большей склонности к экспрессии маркеров истощения и более дифференцированного фенотипа, что установили ранее.

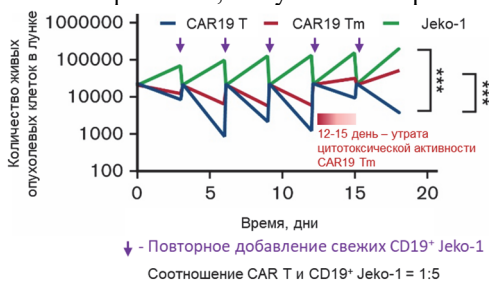


Рисунок 16 – Сравнительный анализ динамики уровня цитотоксичности CAR19 Tm клеток и CAR19 Т клеток в стресс-тесте с регулярной повторной инкубацией со свежими CD19-позитивными таргетными клетками Jeko-1 методом проточной цитофлуориметрии; звездочки означают значимые отличия между CAR19 Tm клетками и CAR19 Т клетками в последние раунды инкубации

CAR19 Tm клетки значительно отличаются от CAR19 Т клеток по экспрессии ряда маркеров – фенотипа, истощения, цитокинов и др.

Для сравнения экспрессии панели маркеров провели анализ транскриптома. Было обнаружено, что CAR19 Tm клетки значительно отличаются от CAR19 Т клеток по профилю экспрессии маркеров дифференцировки Т клеток (LEF1, TCF7, CD86, CD38, IRF8) (Рисунок 17). При этом ранее было показано, что фактор транскрипции TCF7 характеризует более функциональные CAR Т клетки с высоким терапевтическим потенциалом. В то же время CAR19 Tm клетки содержат больше мРНК интерлейкинов суперсемейства ИЛ-2 (ИЛ-4,

ИЛ-15, ИЛ-21) и маркеров истощения Т лимфоцитов (CTLA-4, TIGIT, KLRB1 и др.).

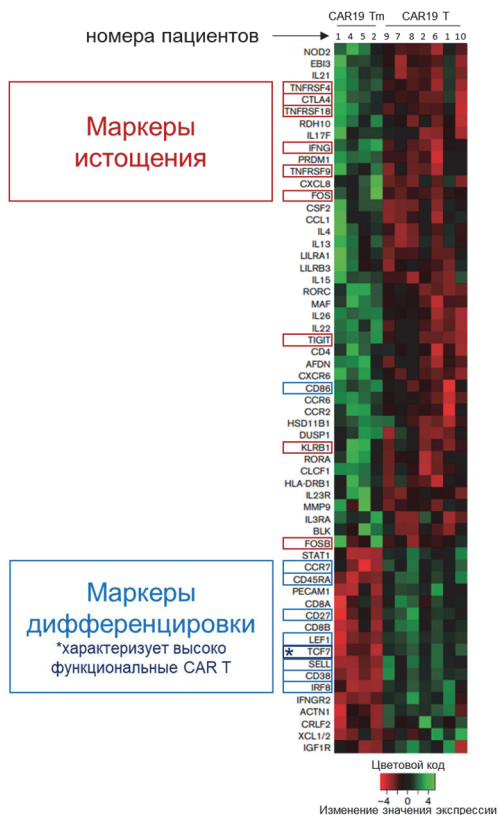


Рисунок 17 – Профили экспрессии CAR19 Tm и CAR19 T клеток

По результатам видно, что CAR19 Tm клетки более истощенные, более дифференцированные, чем CAR19 T клетки, и экспрессируют меньше маркеров, ответственных за более высокий терапевтический потенциал. Вполне вероятно, из-за того, что CAR19 Tm лимфоциты в принципе ограничены по количеству популяций только клетками памяти, проявляются такие различия в транскриптомном профиле.

Для борьбы с истощением CAR T лимфоцитов разрабатываются многочисленные подходы – от регуляции иммунных чекпойнтов (CTLA-4, TIGIT, LAG3) до воздействия на метаболические пути и транскрипционные факторы. Большинство из них применимо и для модификации CAR19 Tm.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе работы были получены устойчивые к аутотоксичности CD45^A CAR45 Т клетки и CD45^A CAR45 NK клетки. Был продемонстрирован специфичный лизис CD45-позитивных клеток крови человека, включая злокачественные, *in vitro*. *In vivo* был продемонстрирован высокий терапевтический потенциал полученных CD45^A CAR45 Т клеток. Адоптивная терапия полученными агентами, при соответствующей защите пациента от длительной их персистенции, может стать клиническим инструментом для борьбы с онкогематологическими заболеваниями, а также может применяться для совмещенного лечения опухолей и кондиционирования пациентов.

Впервые было проведено клиническое исследование аллогенных CAR19 Тm клеток с фенотипом Т лимфоцитов памяти в популяции пациентов с рефрактерным течением В клеточного острого лимфобластного лейкоза в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Полученные данные продемонстрировали эффективную элиминацию опухоли, при этом не проявилась РТПХ тяжелой степени. Детальное сравнительное исследование CAR19 Т клеток и CAR19 Тm клеток выявило различия в их фенотипе, параметрах истощения, транскриптомном профиле и длительности цитотоксической активности, которые необходимо учитывать для успешного клинического применения аллогенных CAR19 Тm клеток.

ВЫВОДЫ

1. Методами генной и клеточной инженерии получены устойчивые к аутотоксичности CD45^A CAR45 Т клетки и CD45^A CAR45 NK клетки;
2. Показана функциональная активность CD45^A CAR45 Т клеток и CD45^A CAR45 NK клеток в отношении человеческих CD45-позитивных клеток крови *in vitro*;
3. Показана способность CD45^A CAR45 Т клеток элиминировать человеческие CD45-позитивные опухоли и РВМС-трансплантат *in vivo*;
4. Впервые показана эффективная элиминация В-клеточной опухоли у пациентов аллогенными CAR19 Тm клетками, полученными из популяции Т клеток памяти гаплоидентичных доноров, в отсутствие тяжелой РТПХ;
5. В сравнительном *in vitro* и *ex vivo* исследовании показано, что CAR19 Тm клетки отличаются от CAR19 Т клеток по ряду характеристик (фенотип, профиль истощения) и быстрее теряют цитотоксическую активность.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. 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., Zang, H., Xia, 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 *Molecular Therapy Oncology*. 2024. V. 32. № 3. P. 200843 (* – эквивалентный вклад);
2. **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. V. 15. № 3. P. 17-26;
3. Ukrainskaya, V. M., Molostova, O. O., Shelikhova, L. N., Pershin, D. E., Kulakovskaya, E. A., **Volkov, D. V.**, Rakhtenko, A.V., Muzalevskii, Y.O., Kazachenok, A.S., Brilliantova, V.V., Osipova D.S., Rubtsov, Y.P., Stepanov A.V., Maschan, M. A. Haploidentical donor-derived memory CAR T cells: first in human experience and in vitro correlative study *Blood advances*. 2022. V. 6. № 19. P. 5582–5588.

Тезисы

1. **Волков Д. В.**, Украинская В. М., Масчан М. А., Степанов А. В. (2022). Создание специфичных к общему лейкоцитарному антигену CAR-T клеток для миело- и иммуноабляции. Перспективные направления физико- химической биологии и биотехнологии. Сборник тезисов. XXXIV зимняя молодежная научная школа. С. 95;
2. **Volkov D. V.**, Ukrainskaya V. M., Osipova D. S., Pershin D. E., Maschan M. A., Stepanov A. V. (2022). CD45 knockout as a strategy for generation universal T and CART cells. FEBS 46. Lisbon. FEBS OPEN BIO. P. 193;
3. **Волков Д. В.**, Украинская В. М., Масчан М. А., Степанов А. В. (2023). Исследование аллореактивности Т-клеток, нокаутных по CD45. Перспективные направления физико- химической биологии и биотехнологии. Сборник тезисов. XXXV зимняя молодежная научная школа, посвященная 40-летию Учебно-научного центра ГНЦ ИБХ РАН. С. 141.

Диссертация выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (грант № 075-15-2024-536)