

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

Волков Дмитрий Васильевич

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности «1.5.3 Молекулярная биология»

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук
Степанов Алексей Вячеславович

Москва 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВЕДЕНИЕ	6
1.1. Актуальность темы исследования.....	6
1.2. Цель работы и поставленные задачи	9
1.3. Научная новизна и практическая значимость работы	10
1.4. Положения, выносимые на защиту.....	10
1.5. Апробация работы	11
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
2.1. Кондиционирующая терапия.....	13
2.1.1. Введение	13
2.1.2. Режимы кондиционирования	14
2.2. Общий лейкоцитарный антиген CD45	18
2.2.1. Структура CD45.....	18
2.2.2. Роль CD45 в онкогематологических заболеваниях.....	21
2.2.3. Функции CD45 в Т и NK клетках	22
2.2.4. Участие CD45 в передаче сигнала ТКР и CAR	25
2.2.5. CD45 как мишень для CAR	28
2.3. CAR Т клеточная терапия	29
2.3.1. Химерный антигенный рецептор.....	29
2.3.2. Недостатки аутологичных CAR Т клеток	33
2.3.3. CD45 как маркер популяций Т клеток.....	35
2.4. Заключение	37
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
3.1. Коммерческие реактивы и наборы.....	38
3.2. Растворы внутрилабораторного приготовления	40

3.3. Методы работы с нуклеиновыми кислотами	41
3.3.1. Полимеразная цепная реакция	41
3.3.2. Электрофорез в агарозном геле	42
3.3.3. Рестрикция.....	42
3.3.4. Лигирование	43
3.3.5. Трансформация клеток <i>E.coli</i>	43
3.3.6. Скрининг колоний.....	43
3.3.7. Нарботка и выделение плазмидной ДНК	44
3.4. Методы работы с белками.....	44
3.4.1. Вестерн-блоттинг	44
3.4.2. Иммуоферментный анализ.....	45
3.5. Методы работы с эукариотическими клетками.....	46
3.5.1. Культивирование.....	46
3.5.2. Заморозка и разморозка клеток.....	48
3.5.3. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови человека, Т и НК клеток	49
3.5.4. Нокаут генов.....	50
3.5.5. Флуоресцентно-активированная сортировка клеток и проточная цитофлуориметрия.....	51
3.5.6. Анализ неспецифической активности CRISPR/Cas9 и секвенирование по Сэнгеру после нокаута.....	52
3.5.7. Конфокальная микроскопия	53
3.5.8. Анализ РНК.....	53
3.5.9. Получение псевдовиральных частиц	54
3.5.10. Определение титра псевдовиральных частиц.....	55

3.5.11.	Трансдукция клеток псевдовиральными частицами	56
3.5.12.	Анализ экспансии CAR T клеток.....	57
3.5.13.	Внутриклеточная детекция провоспалительных цитокинов	58
3.5.14.	Анализ дегрануляции CAR T клеток.....	59
3.5.15.	Анализ цитотоксичности	59
3.5.16.	Стресс-тест или Sequential killing.....	60
3.6.	Методы работы с животными.....	61
3.7.	Статистический анализ	63
4.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	64
4.1.	Введение	64
4.2.	Получение, оценка функциональности и терапевтического потенциала CD45 ^Δ CAR45 T клеток и CD45 ^Δ CAR45 NK клеток.....	64
4.2.1.	Создание CD45 ^Δ T клеток.....	64
4.2.2.	Редактирование гена CD45 не приводит к нарушению функций T клеток	69
4.2.3.	Нокаут гена CD45 не нарушает цитотоксическую функцию CD45 ^Δ CAR19 T клеток <i>in vitro</i>	71
4.2.4.	Нокаут гена CD45 не нарушает цитотоксическую функцию CD45 ^Δ CAR19 T клеток <i>in vivo</i>	74
4.2.5.	Создание CD45 ^Δ CAR45 T клеток.....	77
4.2.6.	CD45 ^Δ CAR45 T клетки эффективнее CAR45 T клеток лизируют CD45- позитивные клетки крови человека <i>in vitro</i>	84
4.2.7.	CD45 ^Δ CAR45 NK клетки лизируют нетрансформированные CD45- позитивные гемопоэтические клетки человека <i>in vitro</i>	90
4.2.8.	CD45 ^Δ CAR45-T-клетки эффективнее CAR45 T клеток элиминируют CD45-позитивные гемопоэтические клетки человека <i>in vivo</i>	93

4.3. Исследование терапевтического потенциала аллогенных CAR19 Т клеток, произведенных из CD45RA-негативных Т клеток памяти	98
4.3.1. История пациентов для терапии аллогенными CAR19 Тm клетками... 98	
4.3.2. Полученные CAR19 Тm клетки отличаются по составу поверхностных маркеров от CAR19 Т клеток..... 99	
4.3.3. CAR19 Тm клетки эффективно элиминируют В клеточный острый лимфобластный лейкоз и не вызывают тяжелой РТПХ..... 101	
4.3.4. CAR19 Тm клетки не уступают CAR19 Т клеткам в реакциях активации и немедленной цитотоксичности, но быстрее теряют способность лизировать таргетные клетки при повторной инкубации с ними	102
4.3.5. CAR19 Тm клетки значительно отличаются от CAR19 Т клеток по экспрессии ряда маркеров – фенотипа, истощения, цитокинов и др.	105
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108
6. ВЫВОДЫ.....	111
СОКРАЩЕНИЯ	112
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	114
ПРИЛОЖЕНИЯ	132
Приложение А	132
Приложение Б.....	134
Приложение В.....	135

1. ВЕДЕНИЕ

1.1. 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. Моноклональные антитела (МкАТ), ингибиторы иммунных контрольных точек и биспецифические антитела – иммунотерапевтические агенты, которые активно применяются для лечения различных злокачественных новообразований. Стремительно развивающимся направлением иммунотерапии является применение Т клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами (CAR T, chimeric antigen receptors modified T cells). Несколько CAR T клеточных препаратов для терапии лимфом и лейкозов уже одобрены к применению Министерством здравоохранения (Российская Федерация), Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными препаратами (Соединенные Штаты) и Европейским агентством по лекарственным средствам (Европейский Союз). Химерные антигенные рецепторы распознают антигены опухолевых клеток независимо от молекул главного комплекса гистосовместимости, что позволяет комбинировать антитело-опосредованное специфическое таргетирование поверхностных маркеров раковых клеток и цитотоксичность Т клеток.

В качестве более безопасной альтернативы исследуют возможность модификации химерными антигенными рецепторами (CAR, chimeric antigen receptors) натуральных киллеров (NK, natural killer), которые обладают рядом преимуществ по сравнению с Т клетками, такими как отсутствие или минимальная вероятность развития синдрома выброса цитокинов (CRS, cytokine release syndrome) и реакции трансплантат против хозяина (РТПХ), а также независимыми от CAR механизмами уничтожения опухолевых клеток.

При разработке иммунотерапии первостепенной задачей является выбор антигена, ассоциированного с опухолью (ТАА, tumor-associated antigen), который не представлен в остальных тканях организма, для преодоления внеопухолевого антиген-опосредованной токсичности. Для онкогематологических заболеваний уникальным антигеном является белок CD45 (здесь и далее по тексту CD – cluster of differentiation – кластер дифференцировки) – тирозиновая фосфатаза, которая также известна как общий лейкоцитарный антиген и присутствует 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). ТГСК была разработана как способ целенаправленного воздействия на кроветворную систему и замены миелоидной и лимфоидной тканей для лечения онкологических и лимфопролиферативных патологий системы кроветворения. Перед процедурой ТГСК необходимо предварительно кондиционировать пациента, удалив собственные клетки костного мозга. Традиционный вариант такого вмешательства требует предтрансплантационной химио- или радиотерапии в дозах, которые высокотоксичны для клеток крови и костного мозга. 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.). Эти нарушения вызывают гиперчувствительность к повреждению ДНК, что является причиной плохого прогноза для таких пациентов при использовании стандартных доз генотоксических препаратов. Более специфичные и безопасные способы кондиционирования включают терапию антителами к различным маркерам

лимфоидных и миелоидных клеток и конъюгатами химио- и радиотерапевтических препаратов с этими антителами. Иммунотерапевтические препараты, нацеленные на CD45, достаточно давно пытаются исследовать и применять в кондиционирующей терапии, показана возможность элиминации гемопоэтических клеток этими препаратами. Однако для полного удаления агрессивных злокачественных клеток, нередко обладающих лекарственной устойчивостью, необходимы агенты на основе иммунных клеток, способные эффективнее 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 эффективному уничтожению клеток крови человека, в том числе, злокачественно трансформированных.

К сожалению, несмотря на впечатляющие результаты применения одобренных CAR T клеточных препаратов и перспективные результаты исследований новых терапевтических клеточных агентов, существует ряд ограничений и нерешенных проблем в использовании модифицированных клеток. Так, в настоящее время, стандартом является использование аутологичных T лимфоцитов пациента для наработки CAR T клеток. Функциональное состояние аутологичных T лимфоцитов зависит от типа и течения заболевания, а также истории лечения пациентов, которые часто сначала получают препараты первой линии, а именно, химио- или радиотерапевтические агенты. Как правило, такое лечение негативно отражается на всех активно делящихся клетках, в том числе и на T лимфоцитах. Поэтому аутологичные T лимфоциты у пациентов, получивших препараты первой линии, обычно функционально истощены, что сильно снижает эффективность лечения полученными из них аутологичными CAR T клетками. Использование здоровых донорских T лимфоцитов для производства CAR T клеток может решить данную проблему, однако, использование аллогенных T лимфоцитов ограничено риском развития РТПХ даже в случае гаплоидентичных доноров, что требует дополнительной модификации аллогенных CAR T клеток. В предыдущих исследованиях, направленных на профилактику вирусных инфекций после ТГСК, было показано, что аллогенные T клетки памяти, негативные по маркеру CD45RA,

можно использовать для инфузии донорских лимфоцитов с целью восстановления противовирусного иммунитета. При этом риск развития РТПХ минимален. В то же время, как показали доклинические исследования, Т клетки памяти (Т_m, memory T cells) подходят для получения CAR Т_m клеток. Последние эквивалентны по эффективности элиминации опухолей обычным CAR Т клеткам *in vivo*, а в случае аллогенного применения не вызывают РТПХ. В этой связи аллогенные CAR Т_m клетки, полученные из CD45RA-негативных Т клеток памяти гаплоидентичных доноров, теоретически могут быть использованы в случае пациентов, ранее перенесших химиотерапию и облучение. Безусловно, необходимо клиническое подтверждение данной гипотезы. Исследование эффективности CAR Т_m клеточной терапии на пациентах и детальное сравнение CAR Т_m клеток и классических CAR Т клеток *in vitro* и *ex vivo*, являются крайне актуальными.

1.2. Цель работы и поставленные задачи

Целью диссертации является 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.

В диссертационной работе были поставлены следующие **задачи**:

1. Получение нокаутных по CD45 CAR45 Т клеток и CAR45 НК клеток для таргетирования пан-лейкоцитарного антигена CD45;
2. Функциональная оценка нокаутных по CD45 CAR45 Т клеток и CAR45 НК 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 аллогенных CAR19 Т клеток, произведенных из Т клеток памяти (CAR19 Т_m) на пациентах;
5. Сравнительный *in vitro* и *ex vivo* анализ CAR19 Т_m клеток и CAR19 Т клеток.

1.3. Научная новизна и практическая значимость работы

В теоретической части работы рассмотрены методы кондиционирующей терапии перед ТГСК, современное состояние CAR T клеточной терапии и ее потенциальное применение в контексте ТГСК, сведения о пан-лейкоцитарном антигене CD45 и его роли в иммунной системе, месте в патологии опухолевых заболеваний и участии в функционировании CAR.

С помощью геномного редактирования гена CD45 были получены устойчивые к кросс-цитотоксичности (аутоксичности) CAR45 T клетки и CAR45 NK клетки нокаутные по CD45 (CD45^Δ), способные элиминировать CD45-позитивные клетки крови человека *in vitro*. Было показано, что CD45^Δ CAR45 T клетки эффективно элиминируют человеческие CD45-позитивные опухоли и трансплантат мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC, Peripheral blood mononuclear cells) человека *in vivo*. В результате, CD45^Δ CAR45 T 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 Tm клетками, полученными из популяции T клеток памяти гаплоидентичных доноров, в отсутствие тяжелой РТПХ. Детальное сравнительное исследование стандартных CAR19 T 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 для пациентов, которые прошли ряд процедур химиотерапии и облучения.

1.4. Положения, выносимые на защиту

1. CD45^Δ CAR45 T клетки и CD45^Δ CAR45 NK клетки лизируют CD45-позитивные клетки человека, включая злокачественные, *in vitro*;

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

1.5. Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены в виде докладов и опубликованных тезисов на конференции с элементами школы молодых ученых «Молекулярные основы заболеваний: что молекулярная биология может сделать для современной медицины» 2021 г., Новосибирск (Россия); на XXXIV и XXXV международных зимних молодежных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» в 2022 и 2023 г., Москва (Россия); на международной конференции FEBS в 2022 г., Лиссабон (Португалия).

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

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.**, Rakhteenko 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.

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

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Кондиционирующая терапия

2.1.1. Введение

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) применяется для лечения пациентов с нарушениями кроветворения, аутоиммунными заболеваниями или злокачественными новообразованиями [1]. После пересадки пациенту донорские стволовые клетки восстанавливают кроветворную систему реципиента. Благоприятный исход трансплантации зависит от многих факторов, включая совместимость по человеческим лейкоцитарным антигенам (HLA, human leukocyte antigen), своевременное предотвращение реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) и эффективное кондиционирование перед трансплантацией [2]. В процессе кондиционирования организм пациента подвергается воздействию высокотоксичных агентов, что, наряду с РТПХ, является одной из главных причин ранней (<100 дней) и поздней (>100 дней) смертности после трансплантации [1].

Несмотря на риски токсичности, кондиционирование является необходимым этапом подготовки для эффективной ТГСК. Во-первых, кондиционирование создает свободное пространство в нишах гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Такие ниши имеют сложную пространственную организацию со множеством различных типов клеток [3, 4] (Рисунок 1). Эти клетки продуцируют молекулярные сигналы, необходимые для восстановления ГСК и поддержания функционирования костного мозга (КМ). Кондиционирование позволяет донорским ГСК занять освободившиеся ниши, чтобы начать восстановление кроветворной системы [5]. Во-вторых, кондиционирование освобождает пространство в микроокружении КМ. Предшественники гранулоцитов и макрофагов заполняют его, формируя кластеры, которые вовлечены в миелопоэз [6, 7].

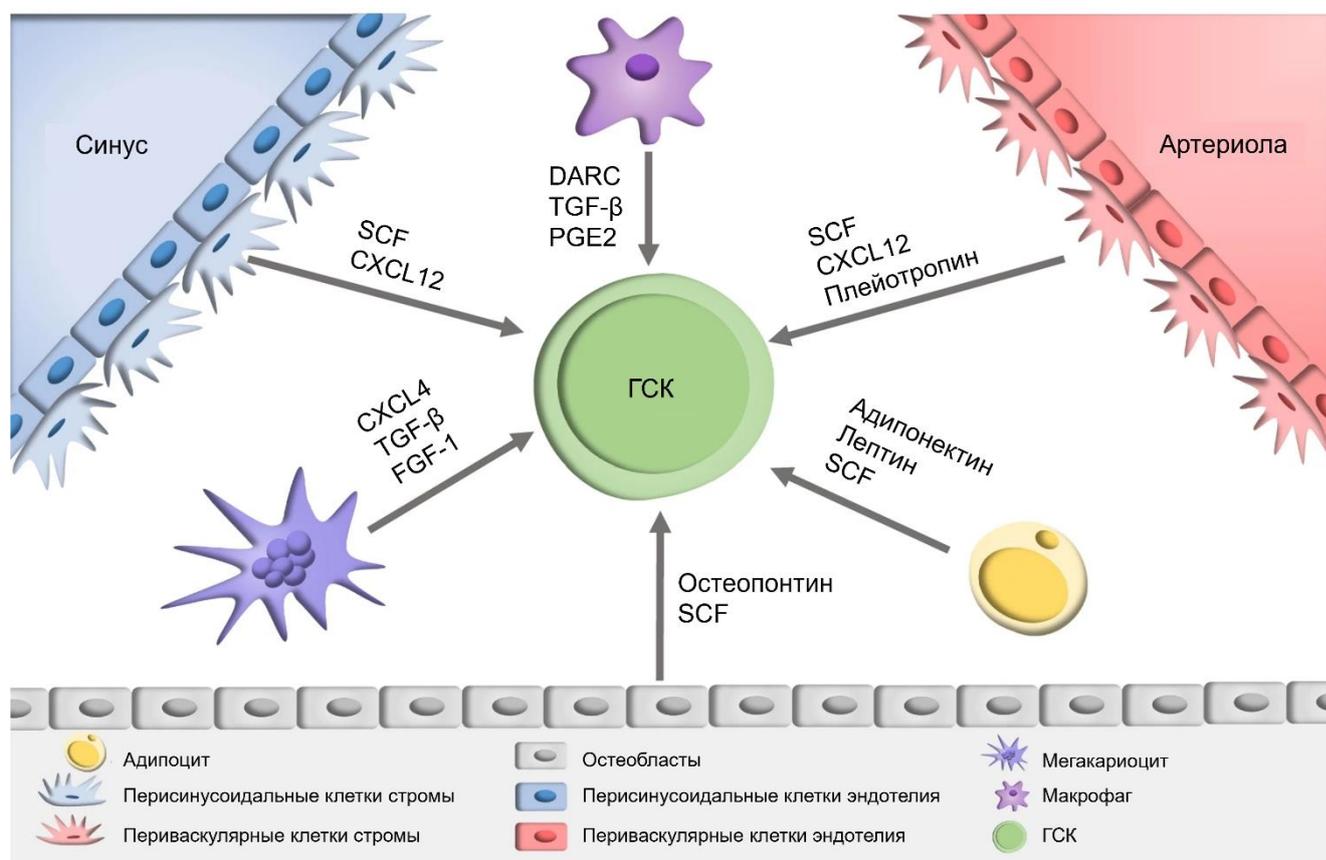


Рисунок 1 – Ниша ГСК (адаптировано из [8])

В-третьих, в случае злокачественных новообразований и аутоиммунных нарушений, кондиционирование позволяет максимально удалить патологический “росток” КМ [9]. Кроме того, использование антитимоцитарного глобулина, циклоспорина, такролимуса или сиролимуса в процессе кондиционирования индуцирует иммуносупрессию для снижения риска отторжения трансплантата и возникновения РТПХ [10, 11].

2.1.2. Режимы кондиционирования

Официальной классификации режимов кондиционирования на сегодняшний момент не предложено. Применяют разные сочетания кондиционирующих агентов, которые обуславливают градацию интенсивности кондиционирования – миелоаблативное, уменьшенной интенсивности и немиелоаблативное [12] (Рисунок 2).

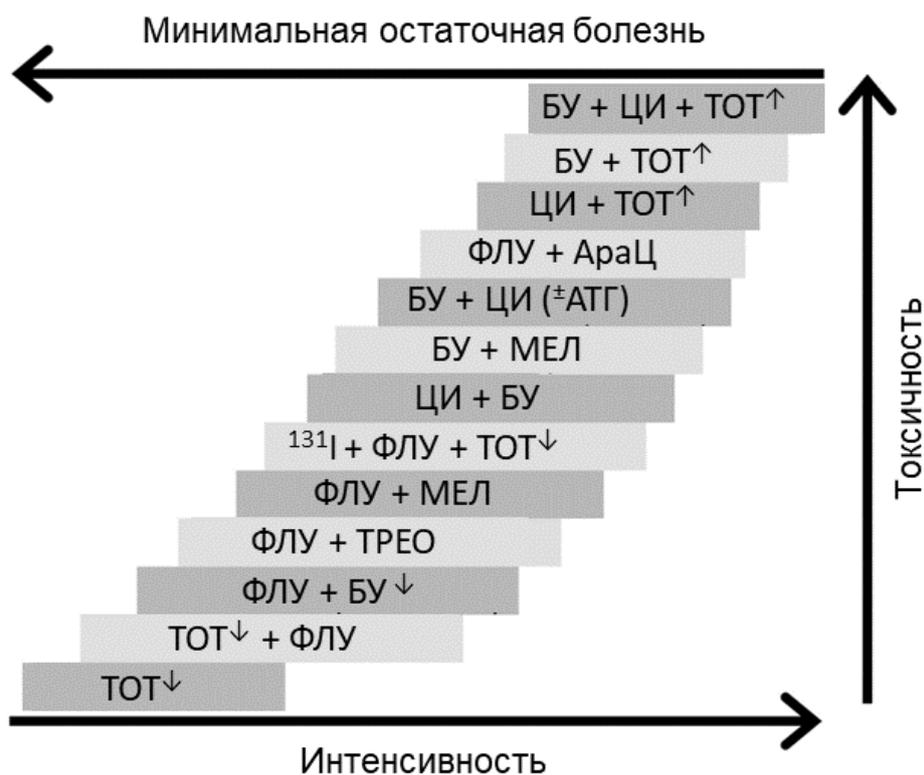


Рисунок 2 – Режимы кондиционирования (адаптировано из [13]); TOT – тотальное облучение тела, ↓ – низкая доза; ↑ – высокая доза, ФЛУ – флударабин, БУ – бусульфан, ТРЕО – треосульфамид, МЕЛ – мелфалан, ^{131}I – конъюгированное с изотопом йод-131 антитело к рецептору CD45, ЦИ – циклофосфамид, АТГ – антитимоцитарный глобулин, АраЦ - цитарабин

До сих пор используют традиционные методы кондиционирования – химиотерапию и облучение, миелоаблативные дозы которых, несмотря на достаточную эффективность, обладают тяжелыми побочными эффектами, связанными с неспецифичной генотоксичностью. Высокая генотоксичность ограничивает применение традиционных режимов кондиционирования. Группой высокого риска являются пациенты с наследственными заболеваниями, связанными с нарушениями репарации ДНК (анемия Фанкони, синдром Ниймеген, синдром Блума, атаксия-телеангиоэктазия), дети, в анамнезе которых есть сопутствующие заболевания и другие факторы риска, и пожилые пациенты [14-17]. Существуют протоколы кондиционирования, использующие средние и низкие дозы химиотерапевтических препаратов и облучения (Рисунок 2), но, к сожалению,

низкие дозы не гарантируют полноценного удаления патологического “ростка” КМ, а также достаточной элиминации собственных иммунных клеток пациента, что негативно отражается на эффективности терапии и приживлении трансплантата [18]. Поэтому, для более эффективной и безопасной ТГСК необходимо создание специфичных и негенотоксичных методов кондиционирования.

В настоящее время также достаточно широко применяют иммунотерапевтические агенты, такие как моноклональные антитела, специфичные к маркерам клеток лимфоидного и миелоидного происхождения (CD52 [19, 20]; CD20 [21, 22]; интегрин $\alpha 4\beta 7$ [23], клиническое исследование #NCT03657160; CD117 [24-26]; CD47 [24, 26]; CD4; CD8; CD40L; CD122 [27] и др.), а также химио- (CD45 [28]; CD117 [29]; CD33 [30]; CD300f [31] и др.) и радиоконъюгаты антител (CD45 – клиническое исследование #NCT02665065; CD20 [32], CD25 – клиническое исследование #NCT04871607; CD66 – клиническое исследование #NCT04082286 и др.) (Рисунок 3).

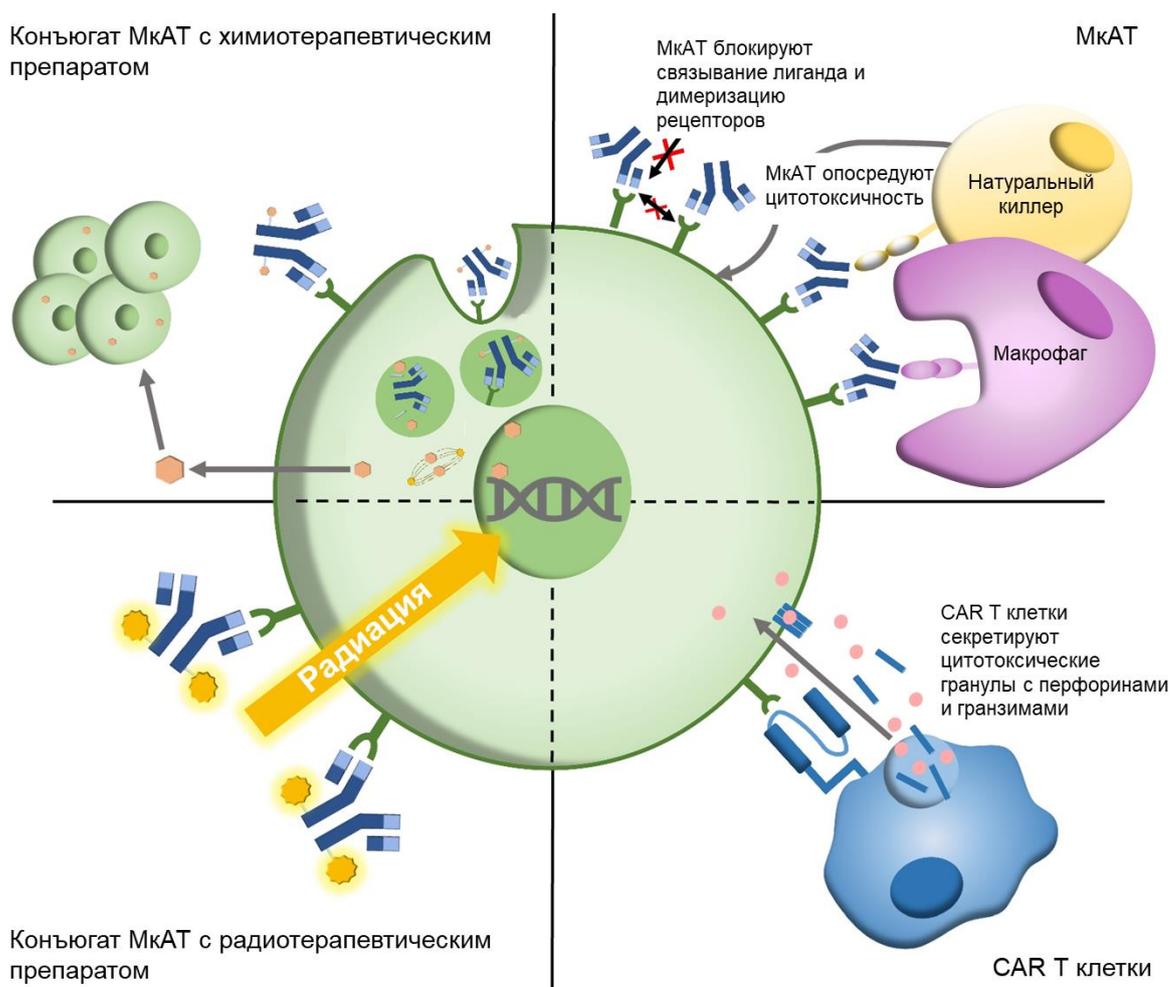


Рисунок 3 – Иммунотерапевтические кондиционирующие агенты (адаптировано из [8])

Введение CAR T клеток в качестве агентов кондиционирования для борьбы с агрессивными злокачественными заболеваниями и максимального избавления от бластов является одним из развивающихся направлений клеточной терапии для ТГСК (Рисунок 3). В доклинических исследованиях уже продемонстрировали эффективную, но узкоспециализированную миелоабляцию ГСК и клеток предшественников CAR T клетками, специфичными к CD117 [33, 34], CD33 [35] и CD123 [36, 37]. 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.

Таким набором параметров обладает антиген CD45 – белковая тирозиновая фосфатаза (PTP, protein tyrosine phosphatase), которая представлена на поверхности практически всех клеток крови за исключением зрелых тромбоцитов и эритроцитов, и отсутствует на клетках других тканей организма [38]. Клетки подавляющего большинства лейкозов и лимфом также несут CD45 на своей поверхности [39, 40]. Благодаря этому можно объединить этапы кондиционирования и терапии рака, что возможно обеспечит более полную элиминацию гемопоэтических клеток пациента и снижение риска сохранения остаточного заболевания или возникновения рецидива после трансплантации.

2.2. *Общий лейкоцитарный антиген CD45*

2.2.1. *Структура CD45*

Тирозиновую фосфатазу CD45 кодирует ген *PTPRC*, в который входит 35 экзонов. Экзоны с 4-го по 6-й содержат гомологичные энхансеры и сайленсеры, регулирующие альтернативный сплайсинг пре-мРНК [41, 42], благодаря которому при созревании мРНК и дальнейшей трансляции образуются 6 обнаруженных изоформ белка (в скобках указаны экзоны, которые остаются в составе продуктов сплайсинга для трансляции указанной изоформы): 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) (Рисунок 4).

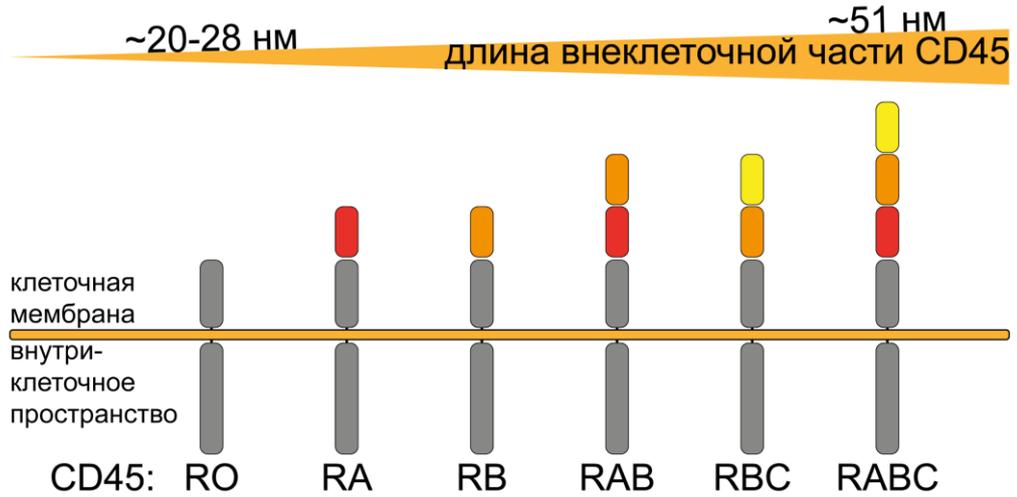


Рисунок 4 – Обнаруженные изоформы CD45 [40]

Все гемопоэтические клетки, кроме зрелых эритроцитов и тромбоцитов, несут разное количество изоформ CD45 в зависимости от степени дифференцировки (Рисунок 5) [38, 39].

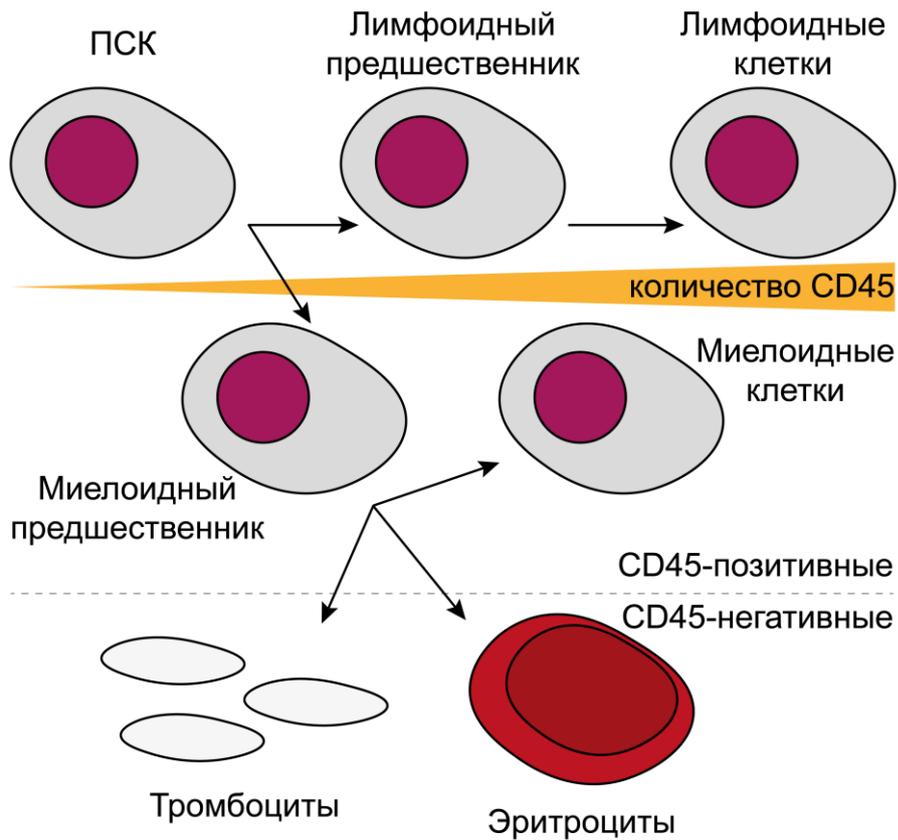


Рисунок 5 – CD45 в клетках гемопоэтического происхождения [40]; ПСК – плюрипотентная стволовая клетка

Внеклеточную область CD45 составляют пять структурных элементов (Рисунок 6). Во-первых, это N-концевой комплекс, состав которого зависит от альтернативного сплайсинга и определяет изоформу фосфатазы. Предполагают, что интенсивное гликозилирование N-конца играет важную роль во взаимодействии рецептора с лигандами и в его функционировании [43].

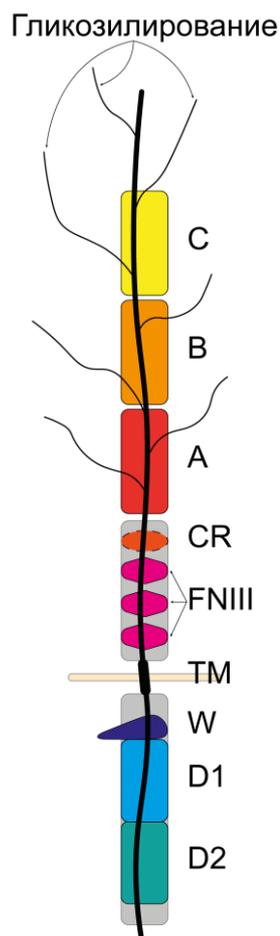


Рисунок 6 – Структура CD45 [40]; А, В, С – внеклеточные участки CD45, определяющие изоформу белка; CR (cysteine rich region) – область, содержащая 5 консервативных цистеинов; FNIII (fibronectin type III) – домены фибронектина типа III; TM – трансмембранный домен; W (wedge-like) – клиновидный домен; D1 – домен с фосфатазной активностью; D2 – домен, необходимый для функционирования CD45 в клетке.

Остальные участки - область с пятью консервативными остатками цистеина и три домена фибронектина III типа - одинаковы для всех изоформ. Внутриклеточная часть фосфатазы состоит из клиновидного домена, фосфатазного домена D1 и домена D2, необходимого для функционирования CD45 [44, 45].

CD45 выполняет важные функции в иммунных клетках, отвечая за начальные стадии их активации, адгезии и миграции. Ключевым элементом в регуляции сигналинга клеток является количественный и качественный состав изоформ CD45, который меняется в зависимости от стадии дифференцировки и активации (например, наивные Т клетки несут длинные варианты белка, а в состоянии активации на поверхности Т лимфоцитов появляются короткие варианты без переменных экзонов) [42]. При активации Т клеток объемная и «жесткая» по структуре фосфатаза вытесняется сближающимися мембранами Т лимфоцита и антигенпрезентирующей клетки (АПК) из центра образующегося иммунного синапса [46].

2.2.2. Роль CD45 в онкогематологических заболеваниях

Широкая распространенность CD45 на опухолевых клетках делает его почти универсальной мишенью для адоптивной терапии различных онкогематологических заболеваний. Количество CD45 и его роль в патогенезе варьирует в зависимости от заболеваний [47-50]. В онкогенезе диффузной В крупноклеточной лимфомы бластные клетки имеют повышенный синтез галектина 3, который обладает антиапоптотическим действием [51, 52]. В свою очередь, галектин 3 связывается с CD45 и остается на мембране. При удалении связанного с CD45 галектина опухолевые клетки становятся более чувствительны к апоптозу [53]. С другой стороны, у пациентов с множественной миеломой обнаружили одновременное присутствие как CD45-позитивных, так и CD45-негативных бластов [54, 55]. Повышенная экспрессия CD45 увеличивает чувствительность бластных клеток к апоптозу, вызванному различными способами: с помощью ингибирования шаперона HSP90, стресса эндоплазматического ретикулума, либо окислительного стресса [55, 56]. С другой стороны, экспрессия CD45 способствует пролиферации опухоли за счет усиления сигнала по пути JAK/STAT: CD45-позитивные клетки способны к пролиферации после стимуляции интерлейкином-6 (далее ИЛ-6), а CD45-негативные – нет, хотя участники пути JAK/STAT

фосфорилированы в обеих популяциях [57]. Видимо, даже несмотря на повышение вероятности апоптоза, интенсивная пролиферация за счет синтеза CD45 обеспечивает высокий прирост CD45-позитивных бластов, и, как следствие, меньшую общую выживаемость пациентов [58]. При детском остром лимфобластном лейкозе повышенный уровень CD45 увеличивает вероятность рецидива [59]. У пациентов с хроническим лимфобластным лейкозом наблюдаются атипичные бластные клетки с небольшим количеством CD45. При этом, преобладание атипичных клеток положительно сказывается на выживаемости пациентов [60].

2.2.3. Функции CD45 в T и NK клетках

CD45 регулирует активацию многих клеток иммунитета, включая важные для противоопухолевой терапии T и NK клетки. Впервые механизм действия CD45 был показан для начальных стадий сигналинга T клеточного рецептора (ТКР) [61]. Фосфатаза отвечает за дефосфорилирование тирозиновых киназ семейства Src (SFK, Src family kinase) как в T лимфоцитах, так и в NK клетках [40]. В свою очередь, киназы вовлечены в огромное количество внутриклеточных сигнальных каскадов, особенно с участием иммунорецепторных тирозиновых мотивов активации (ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif), тирозины которых фосфорилируются SFK, а конкретно Lck и Fyn киназами в случае T и NK клеток, соответственно [62].

Для T клеточного рецептора характерна конкуренция CD45 с киназой Csk, которая фосфорилирует ингибирующий тирозин (Y505) на Lck. CD45 дефосфорилирует Y505 и активирующий тирозин (Y394) поддерживая Lck в состоянии, из которого Lck легче активироваться и запустить аутофосфорилирование [63]. Кроме того, CD45 дефосфорилирует CD3 ζ компонент ТКР/CD3 комплекса, противодействуя активации T клетки [64]. За счет этих механизмов CD45 регулирует как силу, так и частоту сигнала от ТКР [65]. Вероятно комбинация позитивной и негативной функций CD45 (Рисунок 7) обеспечивает

избирательность Т клеток к настоящим мишеням (поврежденные или злокачественные клетки), исключает случайную и чрезмерную активацию, приводящие к негативным последствиям [66].

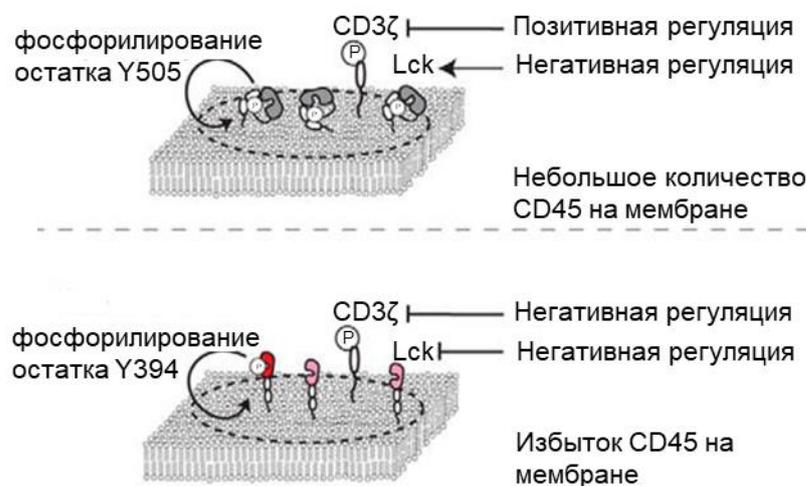


Рисунок 7 – Регуляция CD45 (адаптировано из [67])

В процессе развития Т клеток без CD45 невозможно правильное прохождение позитивной и негативной селекции, при котором сигналинг ТКР определяет дальнейшую судьбу Т лимфоцитов [68]. Важным этапом в развитии Т клеток является переход из двойных негативных лимфоцитов ($CD8^-CD4^-$) в двойные ($CD8^+CD4^+$) и монопозитивные ($CD8^+/CD4^+$). CD45 регулирует этот процесс, потому что синтез корецепторов CD4, CD8 зависит от сигналинга пре-ТКР и ТКР [69-72]. Отсутствие CD45, как и его главного субстрата – Lck – нарушает переходы Т лимфоцитов через разные стадии развития, приводя к дефициту периферических зрелых Т клеток [70, 73].

С другой стороны, для НК клеток не показано такой тонкой регуляции развития клеток. В то же время НК клетки содержат большое количество активирующих рецепторов (NKG2D, NK1.1, NKp46, NKp44, CD16 и др.). Они связаны с внутриклеточными участниками сигналинга – DAP12, FcεRIγ и CD3ζ, которые содержат мотивы ITAM [74] (Рисунок 8).

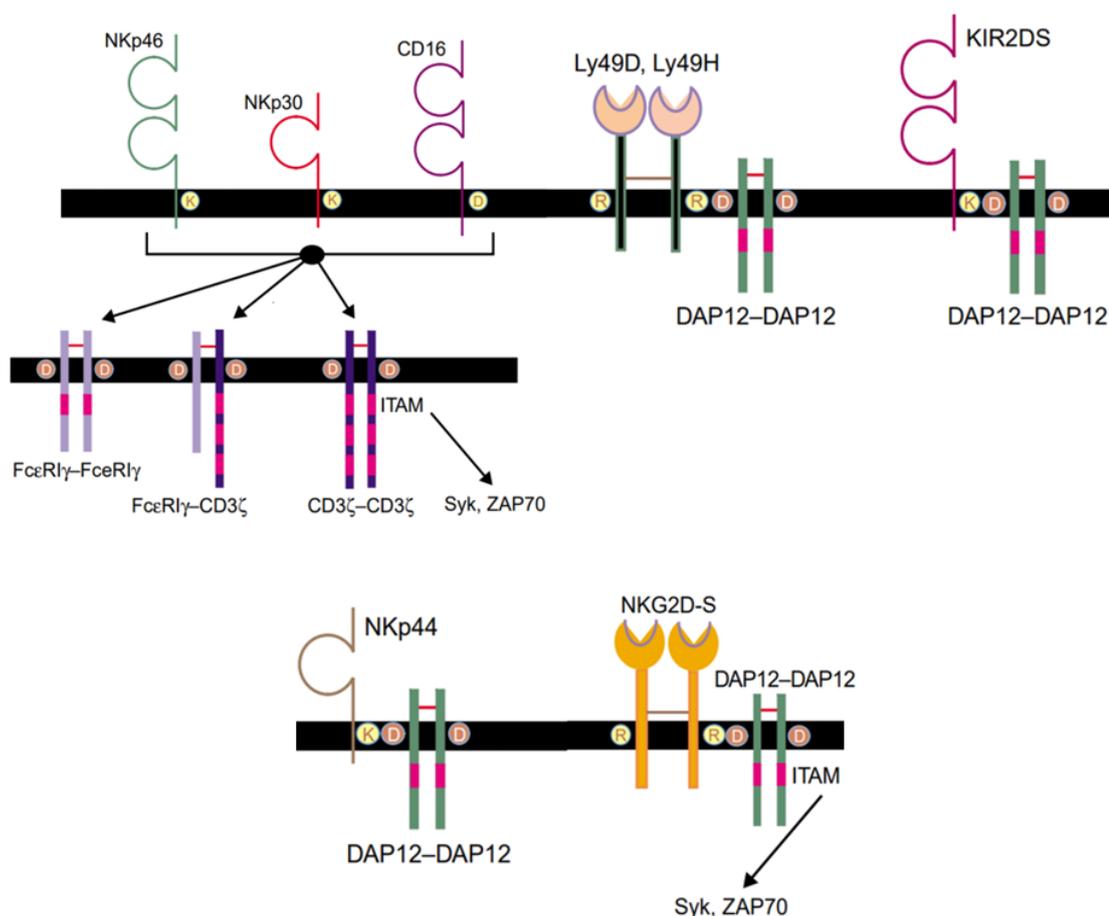


Рисунок 8 – Рецепторы NK клеток с внутриклеточными партнерами (адаптировано из [74])

В свою очередь, тирозиновые киназы SFK в NK клетках также фосфорилируют ITAM, регулируя проведение сигнала, а активность киназ регулирует фосфатаза CD45 [75]. Примечательно, что отсутствие CD45 влияет на разные рецепторы NK клеток по-разному – стимуляция рецепторов NKG2D или Ly49H показала падение цитотоксичности на 20%, по сравнению с CD45-позитивным контролем, а стимуляция рецептора CD16 приводит к одинаковой цитотоксичности, хотя синтез и секреция цитокинов NK клетками уменьшаются [76]. Вероятно, разная вовлеченность CD45 в эти процессы обусловлена силой или продолжительностью сигналинга. Так, для секреции цитотоксических гранул необязательна длительная стимуляция, все происходит в течение нескольких минут, а выделение цитокинов – продолжительный процесс, включающий процессинг белка и его секрецию, требующий устойчивый сигналинг [77, 78].

2.2.4. Участие CD45 в передаче сигнала ТКР и CAR

Молекулярный механизм работы CD45 при активации ТКР сводится к следующему: сначала в область, где будет образован иммунный синапс привлекается киназа Lck, ассоциированная с CD4 или CD8 и CD45. CD45 изначально обеспечивает переходное состояние Lck, которое облегчает активацию киназы, а затем CD45 выталкивается из формирующегося иммунного синапса. В это время Lck аутофосфорилируется, активируется и фосфорилирует CD3 ζ для дальнейшей передачи сигнала (Рисунок 9).

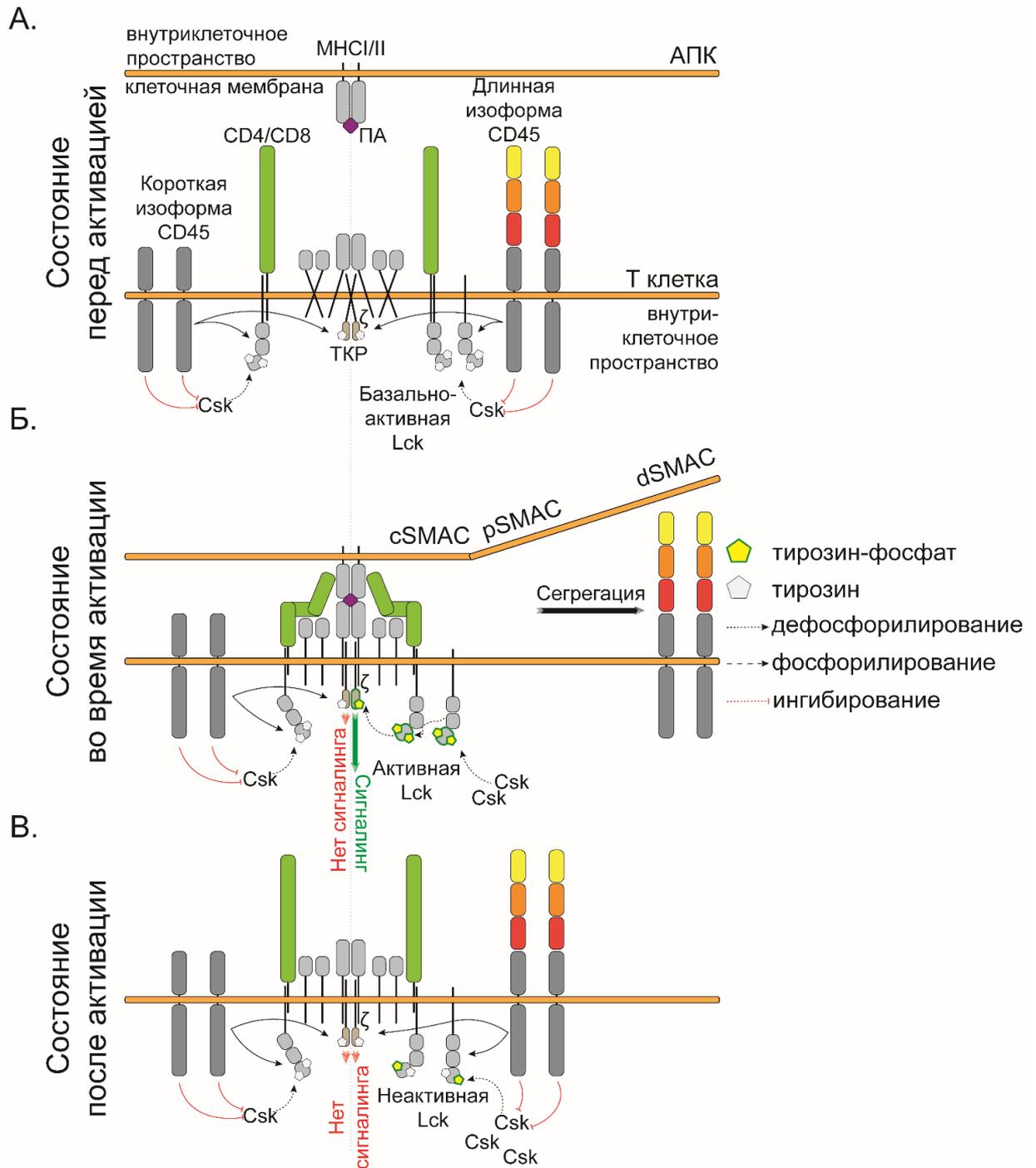


Рисунок 9 – Участие CD45 в сигналинге Т клеточного рецептора [40]; МНС I/II (Major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости I или II класса; АПК – антигенпрезентирующая клетка; ПА – презентированный антиген; ζ – CD3ζ; ТКР – Т клеточный рецептор; Lck, Csk – протеинкиназы; cSMAC, pSMAC, dSMAC (central, peripheral, distal supramolecular activation cluster) – центральный, периферический, дистальный надмолекулярный кластер активации

При активации CAR, который является по сути функциональным аналогом ТКР, хотя и отличается от него по структуре [79], участие CD45 сводится, по-

видимому, к тому же механизму. Предложенная модель поведения при активации рецептора была названа моделью кинетической сегрегации [80]. Как и в случае ТКР, передача сигнала от CAR зависит от SFK и смещения баланса киназ и фосфатаз в области иммунного синапса в сторону киназ. Для CAR19 T клеток была показана взаимосвязь между силой сигнала активации, длиной CAR, связыванием с антигеном и CD45 [81]. Так, увеличение внеклеточного домена CAR и отдаление эпитопа на узнаваемом антигене от мембраны опухолевой клетки снижают сегрегацию CD45 и, соответственно, препятствуют сдвигу баланса в сторону киназ при формировании иммунного синапса, снижая сигнал. Увеличение внеклеточной части CD45, наоборот, способствует усилению сигнала за счет более эффективной сегрегации (Рисунок 10).

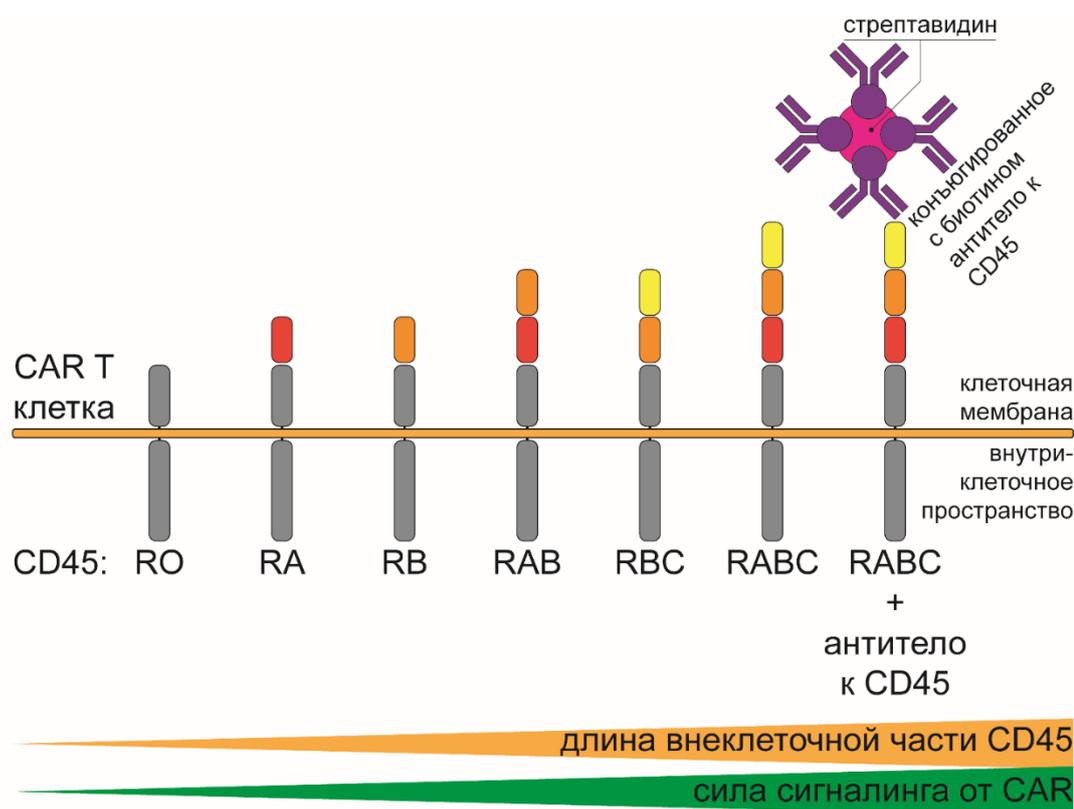


Рисунок 10 – Взаимосвязь размера внеклеточной области CD45 и передачи сигнала от CAR [40]

Что касается CAR NK клеток, то они тоже формируют функциональные иммунные синапсы, в которых CD45 играет похожую роль [82]. В липидном бислое, закрепленном на стеклянной подложке, фиксировали флуоресцентно меченный антиген CD19 и помещали в эту систему CAR19 NK клетки. Удалось наблюдать

центральное скопление CD19, напоминающее центральное скопление ТКР и В клеточных рецепторов [83, 84].

Несмотря на то, что CD45, вероятно, участвует в регуляции CAR-опосредованного сигналинга, нет данных, однозначно свидетельствующих о необходимости CD45 для функционирования модифицированных CAR клеток.

2.2.5. CD45 как мишень для CAR

Широкая распространенность CD45, наряду с очевидным преимуществом, имеет и отрицательное значение для CAR T и CAR NK клеточной терапии, направленной на этот антиген. Так, ключевым препятствием для таргетирования CD45 является кросс-цитотоксичность CAR T клеток и CAR NK клеток по отношению друг к другу. Одним из способов избежать такой аутоксичности является генное редактирование клеток с помощью системы CRISPR/Cas9, способной нокаутить ген, кодирующий целевой белок. Эффективность данного подхода была продемонстрирована для ряда CAR T клеток, распознающих T клеточные антигены (CD1a, CD2, CD3, CD5, CD7 и т.д.) [85-90]. Аналогичным образом, технология CRISPR/Cas9 была адаптирована для нокаута генов, ответственных за возникновение РТПХ [91]. Во всех случаях CAR T клетки были функциональны и эффективно элиминировали опухоли *in vitro* и *in vivo*, хотя наблюдались различия в уровне продукции провоспалительных цитокинов.

Что касается роли CD45 как ключевого регулятора сигналов от иммунорецепторов, то нокаут гена, кодирующего CD45, может потенциально оказать негативное влияние на модифицированные клетки, так как нарушится система фосфорилирования ITAM и баланс активности киназ, необходимый для координированной работы сигнальных каскадов. С другой стороны, пока недостаточно данных, чтобы однозначно утверждать, что отсутствие CD45 негативно скажется на активации модифицированных клеток. Для T клеток на данный момент показано, что недостаток CD45 вызывает нарушения именно в созревании T лимфоцитов в тимусе [70, 73]. Это не представляет проблемы для

CAR T клеток, которые получают из зрелых T лимфоцитов. Потенциальное негативное влияние нокаута CD45 на модифицированные T клетки может быть компенсировано более интенсивным сигналом от CAR, по сравнению с ТКР [92].

В случае NK клеток показано, что их цитотоксичность практически не снижена в отсутствие CD45, хотя продемонстрировано снижение продукции провоспалительных цитокинов [76, 93].

Попытка понять, насколько CD45 важен для опосредованной CAR активации T лимфоцитов и NK клеток, и эффективно ли эти модифицированные клетки элиминируют таргетные клетки в разных условиях, была предпринята в данной работе.

2.3. CAR T клеточная терапия

2.3.1. Химерный антигенный рецептор

Химерный антигенный рецептор или CAR – это рекомбинантная гибридная молекула, которая направляет T клетки на антиген, ассоциированный с опухолью. Распознавание опухолевой клетки в случае CAR происходит независимо от главного комплекса гистосовместимости I класса [94] (Рисунок 11) и с гораздо большей аффинностью [95].

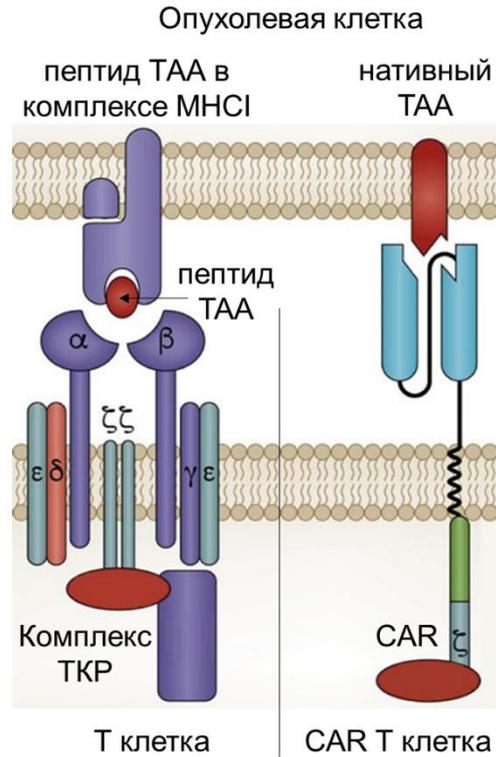


Рисунок 11 – Т клеточный рецептор и химерный антигенный рецептор (адаптировано из [94]); МНС I – главный комплекс гистосовместимости I класса; ТАА – антиген, ассоциированный с опухолью; α, β – субъединицы ТКР; $\epsilon, \delta, \gamma, \zeta$ – представители группы молекул CD3

Структурно CAR можно разделить на три части: внеклеточную с антигенраспознающим доменом, трансмембранную и внутриклеточную с доменом активации [96, 97] (Рисунок 12).

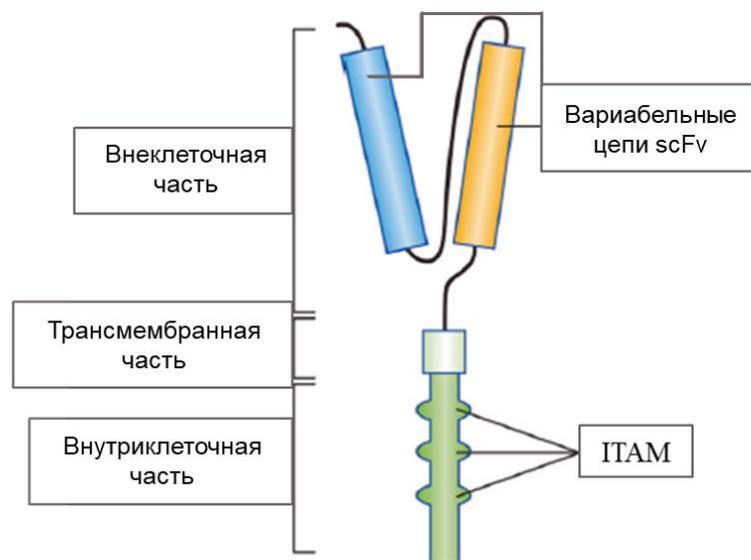


Рисунок 12 – Структура химерного антигенного рецептора (адаптировано из [98]); ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) - иммунорецепторный тирозиновый домен активации; scFv (single-chain variable fragment) – одноцепочечный переменный фрагмент антитела

Внеклеточный домен CAR состоит из сигнального пептида, антигенраспознающего участка и спейсера [96, 97]. За распознавание антигена чаще всего отвечает одноцепочечный переменный фрагмент (scFv, single chain variable fragment) антитела. scFv представляет собой переменные домены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, соединенные подвижным линкером. Спейсер связывает антигенраспознающий домен с трансмембранным. От длины спейсера зависит подвижность и положение распознающего домена относительно молекулы-мишени на опухолевой клетке. Трансмембранный домен закрепляет рецептор в мембране клетки.

Внутриклеточная часть CAR зависит от того, к какому поколению рецепторов принадлежит данный CAR. Эта область CAR состоит из домена активации, который чаще всего является сигнальной частью CD3 ζ , содержащей ITAM. Также внутриклеточная часть может содержать ко-стимулирующие домены, которые

представляют собой сигнальные части ко-стимулирующих рецепторов Т лимфоцитов, и дополнительные регуляторные домены [98] (Рисунок 13).

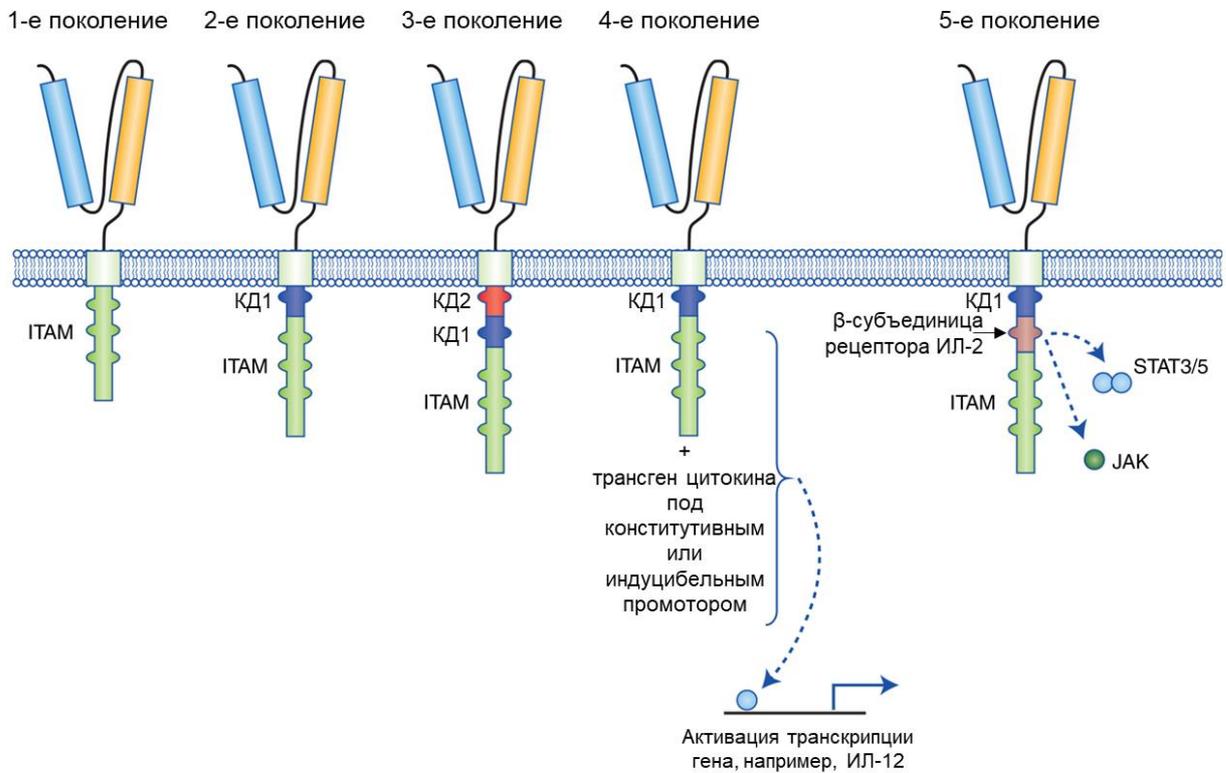


Рисунок 13 – Поколения CAR (адаптировано из [98]); КД – ко-стимулирующий домен; ITAM - иммунорецепторный тирозиновый домен активации

Внутриклеточная часть CAR первого поколения (Рисунок 13) содержит только CD3 ζ . Эксперименты с CAR Т клетками первого поколения показали их низкую цитотоксичность и слабую пролиферацию из-за отсутствия ко-стимулирующего (CD27, CD28, CD134, CD137) сигнала и слабой продукции цитокинов, в частности, ИЛ-2 [99, 100]. Во второе поколение (Рисунок 13) CAR добавили ко-стимулирующий домен из CD28 или CD137, чтобы обеспечить продукцию цитокинов за счет ко-стимуляции, и, за счет этого, усилить пролиферацию CAR Т клеток [101-103]. В третьем поколении (Рисунок 13) ко-стимулирующий домен CD28, который обеспечивает высокую цитотоксическую активность, дополнили еще одним – из CD137 или CD134 для повышения пролиферации и активации большего числа сигнальных каскадов [99]. Четвертое поколение (Рисунок 13) CAR основано на рецепторах второго поколения, но модификация клеток включает в

себя одновременное введение экспрессионной кассеты для продукции цитокина, например ИЛ-12, под конститутивным или индуцибельным промотором. Экспрессия гена, кодирующего CAR, и синтез цитокина происходит либо постоянно, либо при активации CAR. Распознавание ТАА такими CAR T клетками способствует локальной активации других иммунных клеток, в основном NK клеток и макрофагов, для более интенсивной элиминации опухоли [104]. Пятое поколение (Рисунок 13) CAR тоже основано на рецепторе второго поколения, при этом в структуру рецептора добавлен домен бета-субъединицы рецептора ИЛ-2 с сайтом связывания транскрипционного фактора STAT3 [105]. Антиген-специфичная активация рецептора пятого поколения запускает одновременно три сигнальных пути – ТКР-сигналинг (CD3 ζ), ко-стимулирующий сигналинг (CD28) и цитокиновый сигналинг (JAK–STAT). Такой синергизм обеспечивает более физиологичные условия активации модифицированных T клеток, увеличивая их терапевтический потенциал. Кроме того, существуют разновидности CAR, которые не входят в какое-либо из поколений, но обеспечивают более высокий уровень специфичности и безопасности для пациента. Это могут быть универсальные CAR, биспецифические CAR, сплит-CAR, индуцибельные CAR и др. [106].

2.3.2. Недостатки аутологичных CAR T клеток

Адоптивная клеточная терапия модифицированными T лимфоцитами показала впечатляющие результаты в клинике онкогематологических заболеваний. Управление по контролю за продуктами питания и лекарствами США за последние 7 лет одобрило 6 CAR T клеточных препаратов (Таблица 1).

Таблица 1 – Одобренные CAR T препараты

Международное непатентованное наименование	Торговое название	Год одобрения	Мишень	Показания	
 KYMRIAH® (tisagenlecleucel)	Tisagenlecleucel	Kymriah	2017	CD19	В клеточный острый лимфобластный лейкоз В клеточная неходжкинская лимфома
 YESCARTA® (axicabtagene ciloleucel)	Axicabtagene ciloleucel	Yescarta	2017	CD19	В клеточная неходжкинская лимфома Фолликулярная лимфома
 TECARTUS® (brexucabtagene autoleucel)	Brexucabtagene autoleucel	Tecartus	2020	CD19	Мантийноклеточная лимфома В клеточный острый лимфобластный лейкоз
 Breyanzi® (lisocabtagene maraleucel)	Lisocabtagene maraleucel	Breyanzi	2021	CD19	В клеточная неходжкинская лимфома
 Abecma® (idecabtagene vicleucel)	Idecabtagene vicleucel	Abecma	2021	BCMA	Множественная миелома
 CARVYKTI® (ciltacabtagene autoleucel)	Ciltacabtagene autoleucel	Carvykti	2022	BCMA	Множественная миелома

Клинический опыт применения CAR T клеток продемонстрировал высокую эффективность элиминирования опухолей и активную пролиферацию лимфоцитов после введения [107], что, однако, было ассоциировано с рядом осложнений, которые затрудняют лечение существующими CAR T клеточными препаратами и одобрение новых. Основные побочные эффекты направленной на CD19 CAR T клеточной терапии – это синдром выброса цитокинов, нейротоксичность и синдром лизиса опухоли [108-110]. На практике эти осложнения, как правило, успешно купируют с помощью антител к рецептору ИЛ-6 (тоцилизумаб) и кортикостероидов [111], однако действие этих препаратов системное и приводит к подавлению активности иммунитета в целом, что негативно сказывается как на эффективности терапии, так и на устойчивости пациентов к инфекциям.

Еще одна проблема клеточной терапии с помощью CAR T клеток, которая сейчас является терапией последней линии, – это низкое качество стартовой популяции аутологичных T лимфоцитов, которую используют для получения CAR T клеточного препарата. T лимфоциты пациента вследствие химио- и радиотерапии обычно функционально истощены, а поэтому не могут эффективно убивать таргетные клетки и пролиферировать [112]. Кроме того, аутологичные CAR T клетки требуют индивидуального производства для каждого пациента [113], что приводит к задержке с введением терапевтических клеток [114]. Это особенно критично для пациентов с агрессивными пролиферативными заболеваниями, такими как лейкоз в острой форме. У таких пациентов может начаться

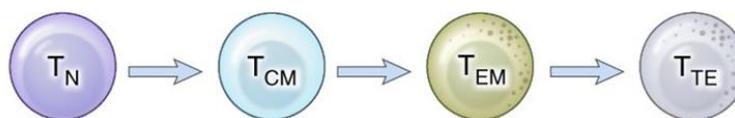
прогрессирование заболевания до того, как препарат аутологических CAR T клеток будет готов к применению. Поэтому цена ошибки и задержки многократно возрастает в случае аутологических CAR T клеток. Кроме того, подстраивание производства CAR T клеточных препаратов для каждого пациента – это затратный по времени и труду процесс, который нуждается в оптимизации [115].

Использование аллогенных T клеток, полученных от здоровых доноров, могло бы стать решением вышеописанной проблемы, так как позволяет заготовить множество CAR T клеточных препаратов различной направленности без потери функциональности. Препятствием для широкого распространения такого подхода является опасность возникновения тяжелой РТПХ и отторжения CAR T клеток. Даже использование гаплоидентичных доноров не лишено рисков развития этих реакций [116, 117].

Обеднение T клеток по наивной популяции снижает риск возникновения аллореактивности и используется в обработке трансплантатов ГСК и инфузий донорских лимфоцитов для снижения риска РТПХ [118, 119]. Такие оптимизированные популяции T клеток можно использовать в создании аллогенной CAR T терапии.

2.3.3. CD45 как маркер популяций T клеток

T лимфоциты присутствуют в крови, вторичных лимфоидных органах и тканях в виде ряда отличающихся по свойствам популяций: наивных T клеток [35], эффекторных T клеток (T_E) и T клеток центральной и эффекторной памяти (T_{CM} и T_{EM}) [120]. Помимо отличий, связанных с наличием или отсутствием предшествующего контакта с антигеном, степенью дифференцировки, способностью секретировать цитокины и хемокины, эти субпопуляции отличаются в том числе наборами характеристических поверхностных маркеров (Рисунок 14). Разнообразие и структура репертуаров также отличаются у разных субпопуляций.



CD45RA	+	-	-	+
CD45RO	-	+	+	-
CD197	+	+	-	-
CD62L	+	+	-	-
CD28	+	+	+/-	-
CD27	+	+	+/-	-
CD127	+	+	+/-	-
CD183	-	+	-	-
CD95	-	+	+	+
CD11a	-	+	+	+
CD122	-	+	+	+
CD58	-	+	+	+
CD57	-	-	+/-	+

Рисунок 14 – Поверхностные маркеры Т клеток на стадиях дифференцировки (адаптировано из [120])

T_N лимфоциты имеют более разнообразный репертуар ТКР, чем $T_{CM/EM}$ клетки [121, 122]. После активации антигеном лимфоциты T_N ($CD45RA^+CD62L^+$) начинают клональную экспансию и дифференцировку в короткоживущие эффекторные клетки и долгоживущие клетки памяти, которые защищают от повторного заражения и включают лимфоциты T_{CM} ($CD45RA^-CD62L^+$) и лимфоциты T_{EM} ($CD45RA^-CD62L^-$). Отличия популяций проявляются не только в присутствии разных маркеров на поверхности, но и в особенностях активации сигнальных каскадов, скорости пролиферации и индукции РТПХ и других иммунных реакций.

Как показали эксперименты на животных, аллогенные T_N клетки вызывают тяжелую РТПХ (3-4 степени), а клетки T_{CM} и T_{EM} – РТПХ низкой степени тяжести (1-2 степени), либо вообще не провоцируют РТПХ [123-129]. Важно отметить, что лимфоциты $T_{CM/EM}$ в то же время обладают эквивалентной цитотоксической активностью в отношении опухолей [128, 130]. Лимфоциты $T_{CM/EM}$ подходят для получения CAR Tm клеток. Доклинические эксперименты показали, что клетки CAR Tm, как и классические CAR T клетки, эффективно элиминируют опухоли *in*

in vivo, а в случае аллогенного применения не вызывают РТПХ [131]. Благодаря таким характеристикам T_{CM} или T_{EM} лимфоциты могут быть использованы в качестве исходного материала при производстве CAR Tm клеток с низким потенциалом к развитию РТПХ. Для отбора оптимальной популяции при выделении T клеток может быть использована технология магнитной деплеции CD45RA-позитивных клеток за счет металлических шариков, покрытых стрептавидином, и биотинилированных MкАТ к CD45RA [132].

Для полноценной оценки преимуществ и недостатков CAR Tm клеток необходимо исследование на пациентах.

2.4. Заключение

Иммунотерапия за последние десятилетия сделала огромный скачок, как в методах, так и в технологиях, что позволило ей занять значимое место в медицине. Клеточная терапия на основе иммунных клеток, модифицированных CAR, – это бурно развивающийся тип иммунотерапии, демонстрирующий впечатляющие результаты, но не ставший пока основным методом лечения пациентов из-за высокой стоимости и рисков, связанных с терапией. Применение CAR клеток является новым направлением и существующий дизайн химерных рецепторов, таргетируемые антигены, способы получения, клеточный состав, методы доставки, технологии регуляции и область применения CAR клеток постоянно совершенствуются.

В данной работе рассмотрены две принципиальные возможности для развития CAR T клеточной терапии – совмещение кондиционирования и противоопухолевой терапии при помощи CAR T клеток с отредактированным геномом, специфичных к CD45, а также применение аллогенных CAR T клеток полученных из популяции T клеток памяти для пациентов с рецидивами опухоли, не отвечающих на терапию стандартными аутологичными CAR T клетками.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Коммерческие реактивы и наборы

Эндонуклеазы рестрикции и соответствующие стандартные буферные растворы (Thermo Fisher Scientific, США; New England Biolabs, Великобритания); дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP) 50X (Евроген, Россия); Q5 High-Fidelity DNA Polymerase 50X, Q5 Reaction Buffer 5X и Q5 High GC Enhancer (New England Biolabs, Великобритания); Tersus polymerase 50X и Tersus Plus Buffer 10X (Евроген, Россия); T4 DNA Ligase, T4 DNA Ligase Buffer 10X (Thermo Fisher Scientific, США); T4 ДНК лигаза, Quick ligation буфер 5X (Евроген, Россия); ScreenMix 5X (содержит Taq полимеразу, реакционный буфер, dNTP и краску для внесения в гель) (Евроген, Россия); Plasmid Midiprep 2.0 (Евроген, Россия); Plasmid Miniprep (Евроген, Россия); Cleanup S-Cap (Евроген, Россия); агароза (Suzhou Yaco Science, Китай); маркер длин ДНК 1 kb (Евроген, Россия); буфер для нанесения ДНК на агарозный гель (Евроген, Россия); RNeasy Midi Kit (Qiagen, Германия); Mint-2 (Евроген, Россия); HiScribe Quick T7 High Yield RNA Synthesis Kit (NEB, Великобритания); AMPure XP kit (Beckman Coulter, США); Spy Cas9 NLS (NEB, Великобритания); ДНКаза I (NEB, Великобритания); ExtractDNA Blood & Cells Kit (Евроген, Россия); BigDye Direct Sanger Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США); бромистый этидий (Биолабмикс, Россия); NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, Великобритания), акриламид (Servicebio, Китай); азид натрия (NaN_3) (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., Индия); N,N-метилен-бисакриламид (бисакриламид) (Панэко, Россия); гидроксид натрия (Sigma, США); персульфат аммония (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., Индия); тетраметилэтилендиамин (TEMED) (Servicebio, Китай); эфир полиоксиэтилена нонилфенола (NP-40) (Servicebio, Китай); натрия додецилсульфат (SDS) (Servicebio, Китай); дезоксихолат (AppliChem, Германия); глицерин (Solarbio, Китай); дитиотреитол (DTT) (Thermo Fisher Scientific, США); бромфеноловый синий (AppliChem, Германия); твин-20 (Servicebio, Китай); сухое обезжиренное молоко (неоFroxx, Германия); фосфат

калия однозамещенный (KH_2PO_4) (Панэко, Россия); фосфат натрия двузамещенный (Na_2HPO_4) (Панэко, Россия); хлороводородная кислота (HCl) (ХИММЕД, Россия); меркаптоэтанол-2 (Sigma, США); BCA assay kit (Thermo Fisher Scientific, США); PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США), PageRuler Plus Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США); кумасси бриллиантовый синий R-250 (Servicebio, Китай); набор для проявления мембраны после вестерн-блоттинга ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham, США), трисгидроксиметиламинометан (Трис) (Панэко, Россия); ЭДТА динатриевая соль (ЭДТА) (Панэко, Россия); уксусная кислота (ХИММЕД, Россия); агар-агар (Difco, Великобритания); ампициллин (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., Индия); дрожжевой экстракт (Difco, Великобритания); изопропиловый спирт (ХИММЕД, Россия); триптон (Difco, Великобритания); хлорид натрия (NaCl) (Панэко, Россия); этиловый спирт 95% (Ферейн, Россия); химически компетентные клетки E.coli штамма XL1-Blue (Evrogen, Россия); хлорид калия (KCl) (Панэко, Россия); хлорид магния (MgCl_2) (Панэко, Россия); D-глюкоза (Servicebio, Китай), среда RPMI 1640 (Gibco, США); среда DMEM с глюкозой 4.5 г/л (ПанЭко, Россия); среда OptiMEM (Gibco, США); среда ТехMACS (Miltenyi Biotec, Германия); среда Криомед-М (Панэко, Россия); фетальная бычья сыворотка (FBS, Fetal bovine serum) (HyClone, США); раствор PBS (ПанЭко, Россия); 0.05% Трипсин-ЭДТА (Gibco, США); раствор антибиотика/антимикотика (100x) (Gibco, США); Glutamax (100X) (Gibco, США); MEM NEAA (100X) (Gibco, США); 0.04% Трипановый синий (Bio-Rad, США); пируват натрия (100X) (Gibco, США); полибрэн (Millipore, США); вектофузин-1 (Miltenyi Biotec, Германия); полиэтиленимин (Sigma, США); ИЛ-2 (Sci-Store, Россия); ИЛ-7 (Sci-Store, Россия); ИЛ-15 (Sci-Store, Россия); дазатиниб (Stemcell, Канада); диметилсульфоксид (Helicon, Россия); CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, США); Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Invitrogen, США); Dynabeads Untouched Human T Cells Kit (Invitrogen, США); NK Cell Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec, Германия); P3 Primary Cell Solution Box (Lonza, Швейцария); QUANTI-Luc (Invivogen, США); гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ (Вектор-Бест, Россия); Интерлейкин-2-ИФА-БЕСТ

(Вектор-Бест, Россия); поли-L-лизин (Sigma, США); бычий сывороточный альбумин (Sigma, США); раствор фикола (Панэко, Россия); MycoReport (Евроген, Россия); форболовый эфир (Invivogen, США); иономицин (Invivogen, США), брэфельдин А (Sigma, США), 5(6)-Карбоксифлуоресцеин диацетат n-сукцинимидиловый эфир (CFSE, Sigma, США), D-люциферин (GoldBio, США), изофлуран (Laboratorios Karizoo, Испания), блинатумомаб (Amgen, США).

3.2. Растворы внутрилабораторного приготовления

Все растворы готовили с использованием воды I класса чистоты (MQ) из системы Milli-Q Integral 3 (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;

PBST (10X): 1 % Твин-20 в PBS;

ТАЕ (50X): 2 М Трис, 1 М уксусная кислота, 50 мМ ЭДТА, pH 8.0;

Буфер для забивки мембраны (вестерн-блоттинг): 25 г/л обезжиренное сухое молоко в PBST;

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

2хYT агаризованная: 18 г/л агар в 2хYT;

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

LB агаризованная: 18 г/л агар-агар в LB;

Super Optimal Broth (SOB): 20 г/л триптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 0.5 г/л NaCl, 2.5 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂;

Super Optimal broth with catabolic repressor (SOC): SOB + 50 мМ глюкоза;

Буфер для лизиса клеток (RIPA): 50 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% дезоксихолат натрия, 1.0 мМ EDTA, 0.1% SDS и 0.01% NaN₃, pH 7.4;

Буфер для нанесения образцов белка (2X): 1% меркаптоэтанол-2, 4% SDS, 0.25 М Трис-HCl, 4 мМ ЭДТА, 10% глицерин, 0.25 мг/мл бромфеноловый синий, pH 6.8;

Электродный буфер (электрофорез по Леммли) (10X): глицин 144 г/л, SDS 10 г/л, Трис 30 г/л, pH 8.3;

Концентрирующий гель (электрофорез по Леммли): 5% смесь акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% SDS, 0.13 М Трис–HCl, pH 6.8, 1 мкл/мл TEMED, 0.1% персульфат аммония;

Разделяющий гель (электрофорез по Леммли): 12% смесь акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% SDS, 0.375 М Трис–HCl, pH 8.8, 0.08% TEMED, 0.1% персульфат аммония;

Буфер для проточной цитофлуориметрии и флуоресцентно-активированной сортировки клеток: 5% FBS, 2 мМ ЭДТА, 0,05% NaN₃ в PBS;

Буфер для фиксации клеток: 4% параформальдегид (Thermo Fisher Scientific, США) в PBS;

Буфер для пермеабилзации клеток при внутриклеточном окрашивании: 0.2% сапонин (Merk, Германия) в PBS;

3.3. Методы работы с нуклеиновыми кислотами

3.3.1. Полимеразная цепная реакция

Для амплификации целевых фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США).

Состав реакционной смеси:

1. Q5® Reaction Buffer 5X
2. dNTP 50X
3. FW праймер на начало фрагмента
4. REV праймер на конец фрагмента
5. Q5 High GC Enhancer
6. ДНК-матрица (1-2 нг)
7. MQ

Реакцию проводили в объеме 50 мкл. Температурный режим приведен в Таблица 2.

Таблица 2 – Температурный режим амплификации

Стадия	Температура	Время	Количество циклов
Предварительная денатурация	95°C	5 мин	1
Денатурация	95°C	20 сек	25
Отжиг праймеров	M°C	20 сек	25
Элонгация	72°C	N сек	25
Элонгация	72°C	5 мин	1
$M = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C),$ где А – количество аденина, Т – количество тимина, G – количество гуанина, С – количество цитозина в последовательности фрагмента;			
$N = K / 2000,$ где К – длина ДНК-фрагмента (пн), 2000 – процессивность полимеразы Q5 (пн/мин)			

3.3.2. Электрофорез в агарозном геле

Для анализа длин фрагментов ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле использовали камеру Owl EasyCast B1 и B2 Mini Gel Electrophoresis System (Thermo Fisher Scientific, США), буфер ТАЕ, источник постоянного тока. Разделение фрагментов проводили при силе тока 150 мА. Агарозный гель (1% агарозы) готовили на основе буфера ТАЕ с добавлением 0.5 мкг/мл бромистого этидия. Результаты электрофореза визуализировали на трансиллюминаторе VersaDoc MP4000 Imaging System (Bio-Rad, США; при 254 нм). При необходимости вырезали полоску с фрагментом определенной длины и выделяли ДНК с помощью набора Cleanup S-Cap.

3.3.3. Рестрикция

Для сборки генетических конструкций плазмидную ДНК и продукты ПЦР обрабатывали эндонуклеазами рестрикции, чтобы образовались липкие концы. На реакцию брали, как правило, 1-2 мкг ДНК, 10X концентрат буфера для рестрикции и ферменты согласно рекомендациям производителя. Доводили водой MQ до

объема 50 мкл. Инкубировали смесь при обозначенной производителем температуре от 30 мин.

3.3.4. Лигирование

Для соединения липких концов ДНК после рестрикции смешивали 50 нг вектора и вставки в молярном соотношении 1:3, концентрат буфера для лигирования и T4 ДНК лигазу в соответствии с рекомендацией производителя. Доводили объем водой MQ до 20 мкл, инкубировали при комнатной температуре от 1 ч. В качестве контроля использовали смесь без вставки. После инкубации либо сразу ставили трансформацию клеток *E.coli*, либо хранили при -20 °С.

3.3.5. Трансформация клеток *E.coli*

Химически компетентные клетки *E.coli* штамма XL1-Blue (Евроген, Россия) трансформировали методом теплового шока. Клетки размораживали на льду, добавляли лигазную смесь (не больше 10% объема от компетентных клеток) или плазмидную ДНК (0.5-1 нг), перемешивали легким встряхиванием, инкубировали 30 мин на льду. Затем помещали пробирки в водный термостат СН-100 (Biosan, Латвия), разогретый до 42 °С, на 45 сек. После этого охлаждали криовиалы на льду 5 мин, добавляли среду SOC (9 объемов среды к 1 объему компетентных клеток), инкубировали в шейкере-инкубаторе ES-20/60 (Biosan, Латвия) при 37 °С 1 ч. Клетки высевали на чашки Петри (Corning, США) с 2хУТ-агаром, содержащих 100 мкг/мл ампициллина. Стерильным шпателем Дригальского L-формы (SPL Lifesciences, Республика Корея) распределяли клетки по чашке, подсушивали чашки и инкубировали в термостате Memmert IF55 (Mettler, Германия) при 37 °С 16-18 ч.

3.3.6. Скрининг колоний

Для скрининга колоний использовали ПЦР. До 16 колоний с соответствующей чашки Петри скалывали сначала в 15 мкл воды MQ, затем в 15 мкл смеси для ПЦР. Смесь состояла из концентрата ScreenMix, 0.2 мкМ специфичных к вектору и ко вставке праймеров и воды MQ. Результаты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле. Пробы вносили в лунки агарозного геля сразу после ПЦР без буфера для внесения, так как необходимые компоненты уже содержались в составе ScreenMix. Оценивали результаты на приборе VersaDoc MP4000 Imaging System.

3.3.7. Нарботка и выделение плазмидной ДНК

Колонию с чашки Петри или смесь MQ с бактериями после анализа скринингом вносили в 5 или 50 мл 2xYT с 100 мкг/мл ампициллина для селекции, растили при 37 °C 16-18 ч в шейкере-инкубаторе на скорости перемешивания 220 об/мин. Затем центрифугированием (4 °C, 10 мин, 3000×g) в Centrifuge 5810R (Eppendorf, Германия) осаждали культуру, досуха отбирали супернатант и либо сразу же переходили к выделению ДНК, либо хранили при -20 °C до следующего дня.

Для выделения плазмидной ДНК на колонках использовали Plasmid Miniprep (5 мл культуры) или Plasmid Midiprep 2.0 (50 мл культуры) в соответствии с рекомендациями производителя.

3.4. Методы работы с белками

3.4.1. Вестерн-блоттинг

Клетки в суспензионной культуре осаждали в количестве 1×10^5 (20 °C, 5 мин, 300×g) в Centrifuge 5810R. Осадок лизировали в буфере RIPA. Концентрацию белка оценивали с помощью набора BCA assay kit согласно рекомендациям производителя. Лизаты смешивали с буфером для нанесения образцов и прогревали

при 90 °C в течение 10 мин. Компоненты образцов разделяли с помощью полиакриламидного электрофореза на 12,5% полиакриламидном геле в течение 1-1.5 ч в камере Mini-Protean (Bio-Rad, США), переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) в Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, США). Мембрану вымачивали в растворе для забивки мембраны, инкубировали с рекомбинантным первичным антителом кролика к человеческому CD45 и конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP, Horseradish peroxidase) козым вторичным антителом к IgG кролика в соответствии с протоколами производителей. В качестве положительного контроля использовали конъюгированное с HRP поликлональное антитело к молекуле GAPDH. Проявляли результаты вестерн-блоттинга (WB, Western blotting) с помощью ECL Plus Western Blotting Detection System на приборе VersaDoc MP4000 Imaging System.

3.4.2. Иммуноферментный анализ

Для оценки секреции провоспалительных цитокинов после активации клеток методом иммуноферментного анализа (ИФА) использовали наборы реактивов Интерлейкин-2-ИФА-БЕСТ и гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ в соответствии с рекомендациями производителя. Перед этим инкубировали таргетные и эффекторные клетки в различных соотношениях 24 ч в 96-луночной планшете (Nest, Китай), затем перемешивали клетки, осаждали (20 °C, 5 мин, 500×g) в Centrifuge 5810R, отбирали 50 мкл супернатанта в новую 96-луночную планшет и либо сразу оценивали концентрацию цитокинов, либо замораживали и хранили при -20 °C до 2-х недель.

Краткая схема эксперимента:

1. На планшет с иммобилизованным антителом к цитокину помещали супернатант;
2. Инкубировали;
3. Промывали;

4. На планшет с цитокином, закрепленном на иммобилизованном антителе, добавляли первичное антитело к цитокину;
5. Инкубировали;
6. Промывали;
7. На планшет с «сэндвичем» из цитокина и антител добавляли вторичное антитело, конъюгированное с HRP;
8. Инкубировали;
9. Промывали;
10. На планшет с HRP добавляли проявляющий раствор;
11. Инкубировали;
12. На планшет с проявляющим раствором добавляли эквивалентный объем стоп-реагента;
13. Анализировали результат.

Результат ИФА оценивали на планшетном спектрофотометре Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, США).

3.5. Методы работы с эукариотическими клетками

3.5.1. Культивирование

В работе использованы следующие клеточные линии и первичные клетки:

1. Адгезионные линии: HEK293T, 293Vec-RD114;
2. Суспензионные линии: Nalm-6, Jeko-1, Raji, Ramos, Jurkat, THP-1, K562, K562f;
3. Суспензионные первичные клетки: Т клетки, НК клетки.

Адгезионные линии культивировали в среде DMEM с содержанием глюкозы 4.5 г/л с добавлением Glutamax (100X), MEM NEAA (100X), пирувата натрия (100X), антибиотика/антимикотика (100X) и FBS 10% (DMEM-F) во флаконах (SPL Lifesciences, Республика Корея) на 25 мм², на 75мм², на 6-луночных планшетах (SPL Lifesciences, Республика Корея), пока клетки не достигали конfluenceности

(покрытия дна) около 80%, которую оценивали на микроскопе DM1000 (Leica Microsystems GmbH, Германия). После этого клетки рассеивали: убирали старую среду, промывали 2 раза PBS, 1 раз раствором трипсин-ЭДТА 0.05%, инкубировали при 37 °С, 5% CO₂ в течение 5 мин до открепления основной части клеток, добавляли 2-3 мл DMEM-F, ресуспендировали, считали, проверяли жизнеспособность. Необходимую для дальнейшего ведения часть клеток разводили в соответствующем объеме свежей среды и засеивали планшет или флакон. Поддерживали жизнеспособность клеток на уровне выше 90%.

Суспензионные линии культивировали в среде RPMI 1640 с содержанием глюкозы 2 г/л с добавлением Glutamax (100X), MEM NEAA (100X), пирувата натрия (100X), антибиотика/антимикотика (100X) и FBS 10% (RPMI-F) во флаконах на 25 мм², на 75мм², на 6-луночных планшетах. Плотность культуры поддерживали на уровне 0.2-2 млн/мл, жизнеспособность – на уровне выше 90%.

Первичные клетки культивировали либо в RPMI-F с добавлением 10 нг/мл (для НК клеток) или 100 нг/мл ИЛ-2 (для Т клеток), либо в среде TechMACS с добавлением 12.5 нг/мл ИЛ-7 и 12.5 нг/мл ИЛ-15 во флаконах на 25 мм², на 75мм², на 6-луночных планшетах. Плотность культуры поддерживали на уровне 0.2-2 млн/мл, жизнеспособность – на уровне выше 90%.

Подсчет и оценку жизнеспособности клеток производили на счетчике TC20 Automated Cell Counter (Bio-Rad, США) в слайдах Cell Counting Slides for TC10/TC20 Cell Counter (Bio-Rad, США) с помощью 0.04% трипанового синего по следующей методике:

1. Ресуспендировали клетки в состоянии суспензии;
2. Отбирали 10 мкл в пробирку;
3. Добавляли в эту же пробирку 10 мкл трипанового синего 0.04%;
4. Интенсивно перемешивали;
5. Переносили 10 мкл в слайды для подсчета;
6. Анализировали результаты на счетчике, который уже учитывал двухкратное разведение.

Используемые клеточные культуры регулярно тестировали на заражение микоплазмой с помощью набора MycoReport согласно инструкции производителя.

3.5.2. Заморозка и разморозка клеток

Для сохранения полученных клеточных культур их замораживали по следующей методике:

1. Выращивали достаточное количество для заморозки;
2. Осаждали (25 °C, 5 мин, 250×g) в Centrifuge 5810R (если клетки были адгезионные, то предварительно их снимали с подложки с помощью PBS и трипсина-ЭДТА 0.05%);
3. Ресуспендировали в среде Криомед-М при плотности 3-5 млн/мл;
4. Помещали криовials в Mr. Frosty Freezing Container (Thermo Fisher Scientific);
5. Хранили при -80 °C до следующего дня;
6. После этого перемещали криовials на длительное хранение в сосуде Дьюара Thermolyne Locator 4 (Thermo Fisher Scientific, США) с жидким азотом.

Размораживали клетки по следующей методике:

1. Вынимали криовиалу из хранилища и помещали в термостат Bead bath (Lab Armor, США), разогретый до 37 °C;
2. Пока дожидались разморозки клеток, готовили пятикратный объем холодной среды DMEM-F или RPMI-F в 15 мл пробирке;
3. Как только клетки подтаивали, содержимое криовиалы перемещали в 15 мл пробирку с приготовленной средой;
4. Осаждали при комнатной температуре (5 мин, 1000 об/мин) в Centrifuge 5810R;
5. Осадок разводили в соответствующем количестве клеток объеме теплой среды DMEM-F или RPMI-F, засеивали в подходящую тару;

6. Инкубировали при 37 °С, 5% CO₂.

3.5.3. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови человека, Т и НК клеток

Для получения первичных Т и НК клеток с помощью наборов первоначально выделяли РВМС из цельной крови пациентов или здоровых доноров (все участники подписывали информирующее согласие) по следующей методике:

1. Цельную кровь здоровых доноров или пациентов собирали либо в клинично-диагностической лаборатории «Инвитро» или «Гемотест», либо в Национальном медицинском исследовательском центре детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева (НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева);
2. Разводили цельную кровь PBS комнатной температуры в соотношении 1 объем крови к 3 объемам PBS;
3. Наслаивали на фиколл комнатной температуры плотностью 1.077 г/см³ в соотношении 1 объем фиколла к 3 объемам смеси крови и PBS;
4. Центрифугировали (25 °С, 45 мин, 650×g) в Centrifuge 5810R;
5. Отбирали большую часть сыворотки, собирали РВМС на границе раздела фаз между сывороткой и фиколлом;
6. Ресуспендировали РВМС в десятикратном объеме PBS комнатной температуры;
7. Осаждали (25 °С, 5 мин, 300×g) в Centrifuge 5810R;
8. Повторяли пункты 6-7;
9. Ресуспендировали в 500 мкл PBS;
10. Считали на TC20 Automated Cell Counter;
11. Необходимый объем отбирали для дальнейшего выделения;
12. Повторяли пункт 7;
13. Ресуспендировали в необходимом количестве соответствующего дальнейшим задачам буфера.

Для выделения Т клеток использовали набор Dynabeads Untouched Human T Cells Kit согласно рекомендациям производителя. После выделения Т клетки активировались с помощью Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 в условиях культивации в течение 3-5 дней.

Для выделения НК клеток использовали набор NK Cell Isolation Kit, human согласно рекомендациям производителя. После выделения НК клетки активировались с помощью фидерной линии клеток K562 (K562f), на поверхности которых есть ИЛ-15, ИЛ-21 и лиганд CD137 (4-1BB), в соотношении НК:K562f = 1:10 в течение 5 дней в условиях культивации.

3.5.4. Нокаут генов

Для того, чтобы убрать рецептор с поверхности клеток, вносили двуцепочечные разрывы в его ген с помощью системы CRISPR/Cas9 и последующего негомологичного соединения концов. Сначала подбирали несколько специфичных последовательностей длиной 20 нуклеотидов с помощью алгоритма Crispor (Tefor Infrastructure, Франция) и синтезировали их в компании Евроген, Россия. Далее собирали полноценные гидовые РНК с помощью HiScribe Quick T7 High Yield RNA Synthesis Kit согласно протоколу производителя. Готовые гидовые РНК очищали AMPure XP kit и обрабатывали ДНКазой I согласно инструкции производителя. Концентрацию полученных РНК измеряли на Qubit system (Thermo Fisher Scientific, США). 2 мкг гидовой РНК смешивали с 3.3 мкл Spy Cas9 NLS (CRISPR/Cas9 смесь), инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Клетки дважды промывали с PBS при комнатной температуре (5 мин, 300×g), ресуспендировали в 100 мкл буфера P3 Primary Cell Solution и соединяли с CRISPR/Cas9 смесью. После этого проводили нуклеофекцию на 4D-Nucleofector (Lonza, Швейцария) согласно протоколу P3 Primary Cell от производителя в зависимости от типа клеток. После этого клетки помещались в RPMI-F с добавками в зависимости от типа клеток. Через 2 дня после нокаута оценивались жизнеспособность и количество клеток на TC20 Automated Cell Counter. При

необходимости нокаутная популяция обогащалась с помощью метода флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS, Fluorescent-activated cell sorting).

3.5.5. Флуоресцентно-активированная сортировка клеток и проточная цитофлуориметрия

Клетки оценивали с помощью окраски специфичными антителами с флуоресцентной меткой или за счет флуоресценции, приобретенной в результате модификации, с последующей детекцией с помощью проточной цитофлуориметрии. Обогащали модифицированную популяцию с помощью FACS. Для этих процедур использовали антитела с флуоресцентными метками (Таблица 5 приложения А). Клетки к обеим процедурам готовили сходным образом:

1. Отбирали необходимое количество клеток;
2. Осаждали при комнатной температуре (5 мин, 300×g) в Centrifuge 5810R;
3. Ресуспендировали в соответствующем количестве клеток объеме холодного буфера для цитофлуориметрии;

Шаги 4-9 использовали, если клетки необходимо было покрасить специфичными антителами с флуоресцентной меткой:

4. Добавляли специфичные антитела с флуоресцентной меткой в разведении, рекомендуемом производителем;
5. Инкубировали на льду в темноте в течение 40 мин;
6. Добавляли десятикратный объем холодного PBS;
7. Осаждали (4-8 °C, 5 мин, 300×g) в Centrifuge 5810R;
8. Повторяли шаги 6-7;
9. Ресуспендировали в первоначальном объеме холодного PBS;
10. После этого:

- a. Либо анализировали клетки на цитофлуориметре ACEA NovoCyte (Agilent, США) в соответствии с протоколом производителя, для

анализа данных использовали программное обеспечение ACEA NovoExpress (Agilent, США);

- б. Либо сортировали клетки на сортере SH800S (Sony Biotechnology, США) в соответствии с протоколом производителя, для анализа данных используя соответствующее программное обеспечение от производителя.

3.5.6. Анализ неспецифической активности CRISPR/Cas9 и секвенирование по Сэнгеру после нокаута

Для оценки изменений в геноме T клетки после нокаута анализировали на присутствие инсерций и делеций с помощью секвенирования по Сэнгеру (на второй день после нокаута), а также на ошибки редактирования (off-target) системой CRISPR/Cas9 с помощью секвенирования следующего поколения (через 4, 8 и 16 ч после нокаута).

Из клеток выделяли геномную ДНК с помощью набора ExtractDNA Blood & Cells Kit согласно инструкции производителя.

Далее либо с помощью BigDye Direct Sequencing Kit и праймеров GCAAAGAGGACCCTTACAGTAT и AGATACAGATAGACATTTGCTTTC, секвенировали участок гена CD45 в районе посадки гидовой РНК на 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fischer Scientific, США) согласно инструкции производителя, либо проводили off-target анализ.

Для анализа неспецифической активности CRISPR/Cas9 идентифицировали 183 потенциальных участка ошибочного редактирования с помощью алгоритма Crispor. Далее отобрали из них 20 наиболее вероятных участков с максимальным значением показателя CFD (cutting frequency determination), который характеризует специфичность гидовой РНК к участку редактирования и 5 участков, которые находятся в экзонах, независимо от значения CFD. Для каждого выбранного участка были синтезированы концевые праймеры с помощью алгоритма Primer-BLAST (NIH, США). В качестве положительного контроля использовали праймеры,

фланкирующие участок связывания гидовой РНК в гене *PTPRC*. Такой набор праймеров был использован для мультиплексной ПЦР с геномной ДНК. Мультиплексные ампликоны соединяли с Illumina TruSeq adapters (Illumina, США), используя NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina, объединяли и секвенировали на Illumina NextSeq 550 (Illumina, США) методом секвенирования спаренных концов согласно протоколу производителя с глубиной прочтения 2.1-2.8 млн индивидуальных последовательностей (ридов). Риды обрабатывали с помощью алгоритма TrimGalore v0.6.4 и соотносили с человеческим геномом версии Hg38 в программе Bowtie 2 v2.3.5.1 [133]. Процент инсерций и делеций считали с помощью алгоритмов R и дополнительной библиотеки GenomicAlignments.

3.5.7. Конфокальная микроскопия

Наличие или отсутствие рецептора CD45 после нокаута подтверждали с помощью конфокальной микроскопии. Для этого клетки помещали на обработанные поли-L-лизином планшеты со стеклянным дном (Ibidi, Германия), осаждали при комнатной температуре (10 мин, 100×g). Прикрепленные таким образом клетки фиксировали 4% формалином при комнатной температуре 1 час и окрашивали антителами к человеческому CD45 (Abcam, США) с флуоресцентной меткой. Изображения получали на микроскопе Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss AG, Германия) с вращающимся диском Yokogawa spinning disc confocal device CSU-X1 (Yokogawa Corporation of America, США).

3.5.8. Анализ РНК

Для сравнительной оценки CAR19 Tm клеток и CAR19 T клеток анализировали разницу в их транскриптом с помощью nCounter Digital Analyzer (NanoString, США).

Сначала выделяли тотальную РНК на колонках с помощью RNeasy Midi Kit согласно инструкции производителя. Качество и количество РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, США) в 1 мкл образца. После измерения доводили концентрацию до 100 нг/мкл.

Далее образцы с полученной концентрацией анализировали с помощью nCounter Digital Analyzer. Каждый транскрипт генов интереса маркировали с помощью двух зондов – захватывающего и репортерного. CAR T клеточная панель, предоставляемая производителем, позволяла детектировать до 800 разных генов в образце. Для маркировки проводили гибридизацию образцов с зондами при 65 °С в течение 16 ч на CT1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, США) согласно протоколу производителя. После этого несвязавшиеся зонды отмывали, а оставшиеся закрепляли на чипе, который затем сканировали в nCounter Digital Analyzer. Уровень экспрессии генов определялся непосредственно количеством сигнала от соответствующих им зондов. Для дальнейшего анализа “сырых” данных использовали программное обеспечение nSolver v3.0 (NanoString, США).

3.5.9. Получение псевдовиральных частиц

Для модификации клеток использовали лентивирусные и ретровирусные частицы. Их получали с помощью клеток HEK293T и 293Vec-RD114 не менее, чем третьего пассажа после разморозки, по следующей методике:

1. Трансфекция (для чашек Петри 100 мм):
 - а. Засевали 7.5×10^6 клеток на чашку за 24 ч до трансфекции;
 - б. В день трансфекции готовили в бессывороточной среде две смеси:
 - 1) пакирующих плазмид (необходимых для сборки лентивируса третьего поколения) с плазмидой интереса (содержащей ген CAR и/или люциферазы светлячка (ffLuc, firefly luciferase) в тандеме с геном зеленого флуоресцентного белка (GFP, green fluorescent protein), если планировалась наработка лентивирусов; плазмиды интереса, если планировалась наработка ретровирусов; 2)

трансфецирующего агента – полиэтиленимина; соотношение по массе ДНК:трансфецирующий агент = 1:3;

- в. Смешивали 1) и 2);
- г. Инкубировали при комнатной температуре 30 мин;
- д. Смешивали с DMEM-F;
- е. Отбирали старую среду у клеток и заливали средой с трансфецирующей смесью;
- ж. Инкубировали до следующего дня при 37 °С 5% CO₂;
- з. Меняли среду на свежую DMEM-F.

2. Сбор вирусов:

- а. Через 48 ч после трансфекции собирали супернатант;
- б. Осаждали остатки клеток (10 °С, 5 мин, 300×g) в Centrifuge 5810R;
- в. Собирали супернатант;
- г. Осаждали мелкие частицы (10 °С, 5 мин, 5000×g) в Centrifuge 5810R;
- д. Собирали супернатант;
- е. Либо аликвотили по 300-500 мкл в пробирки 0.65 мл (Eppendorf, Германия), быстро замораживали в жидком азоте и хранили на -80 (ретро- и лентивирусы); либо хранили при 4 °С не дольше двух недель, используя незамороженными (лентивирусы).

3.5.10. *Определение титра псевдовиральных частиц*

Для оценки качества наработанных вирусов и примерной оценки процента вероятной трансдукции полученные псевдовиральные частицы титровали на клетках HEK293T по следующей методике:

1. За 24 ч рассеивали HEK293T на 24-луночный планшет (SPL Lifesciences, Республика Корея) по 5×10^4 клеток на лунку в DMEM-F;
2. На следующий день меняли среду, добавив при этом полибрен (в случае лентивирусов) или вектофузин-1 (в случае ретровирусов) до финальной концентрации 10 мкг/мл;

3. Немедленно методом серийных разведений готовили псевдовиральные частицы в различной концентрации (шаг разведения в 3 раза, начиная с 300 мкл чистого супернатанта);
4. Добавляли разведенные пробы к клеткам по каплям;
5. Инкубировали при 37 °С 5% CO₂ до следующего дня;
6. На следующий день меняли среду на свежую DMEM-F;
7. Через 2 дня оценивали процент трансдуцированных клеток с помощью проточной цитофлуориметрии;
8. Строили кривую заражения – зависимость % трансдукции от объема (разведения) псевдовиральных частиц;
9. По ней определяли титр, которым считали объем вируса, который необходим для заражения 50% клеток.

3.5.11. Трансдукция клеток псевдовиральными частицами

Для конститутивной экспрессии генов интереса, их внедряли в клетки с помощью трансдукции ленти- и ретровирусными частицами. Трансдукцию Т клеток проводили на второй день после выделения и активации, трансдукцию НК клеток проводили на 5 день после выделения и активации. Трансдукцию клеточных линий проводили не менее, чем на третьем пассаже после разморозки. Использовали следующую методику:

1. Лентивирусные частицы:
 - а. В день трансдукции клетки рассеивали в концентрации 1 млн/мл в 12- или 6-луночные планшеты (SPL Lifesciences, Республика Корея);
 - б. Добавляли полибрен до финальной концентрации 10 мкг/мл;
 - * Если трансдуцировали Т клетки в среде RPMI-F, то добавляли 100 нг/мл ИЛ-2;
 - в. Затем добавляли супернатант с псевдовиральными частицами по каплям в объеме, рассчитанном с помощью предварительного титрования;

- г. После этого проводили спинфекцию (32 °С, 90 мин, 1200×g) в Centrifuge 5810R;
- д. Затем инкубировали при 37 °С 5% CO₂ до следующего дня;
- е. После этого меняли среду на свежую RPMI-F, а в случае Т клеток либо на RPMI-F с добавлением 100 нг/мл ИЛ-2, либо на TechMACS с добавлением 12.5 нг/мл ИЛ-7 и 12.5 нг/мл ИЛ-15;
- ж. Оценивали процент трансдукции на 2-3 день после смены среды с помощью проточной цитофлуориметрии;
- з. В случае необходимости обогащали процент трансдукции с помощью FACS;

2. Ретровирусные частицы:

- а. В день трансдукции клетки рассеивали в концентрации 1 млн/мл в 12- или 6-луночные планшеты;
- б. Добавляли вектофузин-1 до финальной концентрации 10 мкг/мл;
- в. Добавляли ИЛ-2 до финальной концентрации 100 нг/мл;
- г. Затем добавляли супернатант с псевдовирусными частицами по каплям в объеме, рассчитанном с помощью предварительного титрования;
- д. После этого проводили спинфекцию (32 °С, 120 мин, 400×g) в Centrifuge 5810R;
- е. Затем инкубировали при 37 °С 5% CO₂ два дня;
- ж. После этого меняли среду на свежую: либо на RPMI-F с добавлением 10 нг/мл ИЛ-2, либо на TechMACS с добавлением 12.5 нг/мл ИЛ-7 и 12.5 нг/мл ИЛ-15;
- з. Оценивали процент трансдукции на 2-3 день после смены среды с помощью проточной цитофлуориметрии.

3.5.12. Анализ экспансии CAR Т клеток

По 1×10^5 CAR T или T клеток заседали в 24-луночные планшеты в среду TechMACS, дополненную 12.5 нг/мл ИЛ-7 и 12.5 нг/мл ИЛ-15, с добавлением или без добавления 50 нМ дазатиниба. Количество и жизнеспособность клеток оценивали каждые 2 дня в течение 2 недель методом проточной цитофлуориметрии.

3.5.13. Внутриклеточная детекция провоспалительных цитокинов

По 3×10^5 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 эффекторныe 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 пермеабиллизации при комнатной температуре (5 мин, 500×g), блокировали 5% FBS, окрашивали антителами к человеческим интерферону гамма (ИФН-γ) и ИЛ-2 в течение 40 мин при комнатной температуре в буфере для пермеабиллизации 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.

3.5.14. *Анализ дегрануляции CAR T клеток*

CAR T клетки ресуспендировали в среде TechMACS в концентрации 2 млн/мл. По 100 мкл клеток переносили в 96-луночный планшет и добавляли по 2 мкл антитела к человеческому CD107a в каждую лунку. CAR T клетки смешивали с клетками Јеко-1 в соотношении 1:1, в качестве контроля использовали лунки, содержащие только T клетки. Инкубировали планшет при 4 °C в течение 2 ч в темноте. Клетки дважды промывали средой TechMACS (5 мин, 4 °C, 300×g), ресуспендировали в среде TechMACS и окрашивали антителами к человеческим CD3, CD4 и CD8 при 4 °C в течение 30 мин. Затем клетки дважды промывали PBS (5 мин, 4 °C, 300×g), ресуспендировали в 120 мкл PBS и анализировали методом проточной цитометрии.

3.5.15. *Анализ цитотоксичности*

Эффекторные клетки (T, NK клетки и их модифицированные варианты) инкубировали в присутствии различных таргетных клеток (опухолевых и других CD45-позитивных) с различным соотношением E:T (где E – эффекторные клетки, а T – таргетные клетки) в среде RPMI-F, дополненной 100 нг/мл ИЛ-, или TechMACS, дополненной 12.5 нг/мл ИЛ-7 и 12.5 нг/мл ИЛ-15 при 37 °C с 5% CO₂. В некоторых случаях инкубацию проводили в присутствии дазатиниба или блинатумомаба. Оценку цитотоксического потенциала проводили несколькими способами – проточной цитофлуориметрией, детекцией высвобождающейся лактатдегидрогеназы из убитых клеток, ежечасной детекцией падения флуоресцентного сигнала.

1. Проточную цитофлуориметрию проводили после инкубации от 24 до 72 ч. Основным показателем было уменьшение таргетной популяции, которая выделялась с помощью окрашивания специфическими антителами с флуоресцентными метками, или благодаря продукции флуоресцентного

белка. Формула для расчета цитотоксичности: $c = \left(1 - \frac{a}{b}\right) * 100\%$, где c – цитотоксичность, a – количество оставшихся живых таргетных клеток, b – количество таргетных клеток в контрольной лунке (без эффекторных);

2. Детекцию лактатдегидрогеназы проводили после инкубации от 4 до 9 ч. Основным показателем была оптическая плотность раствора после обработки супернатанта от инкубированных клеток с помощью набора CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay согласно инструкции производителя. Формула для расчета цитотоксичности: $c = \frac{a - \text{espont} - \text{tspont}}{\text{tmax} - \text{tspont}} * 100\%$, где c – цитотоксичность, a – оптическая плотность в экспериментальной лунке, espont – оптическая плотность в лунке только с эффекторными клетками, tspont – оптическая плотность в лунке только с таргетными клетками, tmax – оптическая плотность в лунке с 100% лизиса, который достигается с помощью лизис-буфера из набора;
3. Непрерывное наблюдение за падением флуоресцентного сигнала осуществляли на приборе Incucyte (Sartorius, Германия) согласно инструкции производителя в течение 48 ч. Основным показателем была площадь под кривой зависимости свечения от времени инкубации, на основании нее оценивали цитотоксическую активность.

3.5.16. *Стресс-тест или Sequential killing*

Эффекторные клетки (Т, НК клетки и их модифицированные варианты) инкубировали в присутствии различных таргетных клеток (опухолевых и других CD45-позитивных) при 37 °С с 5% CO₂ в течение 2-3 недель с периодическим добавлением свежей порции таргетных клеток раз в три дня с восстановлением их первоначального соотношения с эффекторными. Оценку проводили с помощью проточной цитофлуориметрии, таргетная популяция выделялась с помощью окрашивания специфическими МкАТ с флуоресцентными метками (Таблица 5 приложения А), или благодаря продукции флуоресцентного белка. Отслеживали

момент прекращения цитотоксической активности у эффекторных клеток, а также изменения в численности таргетных клеток.

3.6. Методы работы с животными

Экспериментальные процедуры с участием животных проводили в соответствии с рекомендациями по надлежащему использованию и уходу за лабораторными животными. Протоколы экспериментов были одобрены Институтской Комиссией по контролю за содержанием и использованием животных ИБХ РАН. Для всех процедур животные были предоставлены питомником «Пушино» на базе ФИБХ РАН в г. Пушкино из коллекции лабораторных грызунов СПФ статуса для фундаментальных, медико-биологических и фармакологических исследований (ФИБХ РАН, Россия). За содержание животных в соответствии с международными стандартами отвечали сотрудники питомника. Для *in vivo* экспериментов использовали самцов и самок лабораторных мышей линии *NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{em1Smoc}* (NCG) возраста 6-8 недель весом 21-24 грамма.

Визуализацию развития опухоли проводили с помощью внутрибрюшинного введения 15 мг/мл раствора D-люциферина в PBS в количестве 3 мг/мышь и дальнейшей детекции люминесценции в системе IVIS Lumina III (PerkinElmer, США) при анестезии изофлураном на приборе RAS-4 (PerkinElmer, США).

Кровь для анализа методом проточной цитофлуориметрии забирали из ретроорбитального синуса с помощью гепаринизированных капилляров (МиниМед, Россия) в пробирки с ЭДТА (МиниМед, Россия). Использовали МкАТ с флуоресцентными метками (Таблица 5 приложения А).

Для оценки выживаемости животных содержали под наблюдением в течение 11-13 недель.

Схемы экспериментов с мышами:

- Эксперимент с CD19-позитивными опухолевыми клетками:

Мышам 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 CD45 Δ CAR19 Т клеток, CAR19 Т клеток или нетрансдуцированных [90] Т клеток (контрольная группа) на 7 день после приживления опухоли. За развитием опухолей наблюдали еженедельно в течение 5 недель.

- Эксперимент с CD45-позитивными опухолевыми клетками:

Мышам 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 CD45 Δ 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.

- Эксперимент с PBMC:

Мышам внутривенно вводили 20×10^6 PBMC от здорового донора. Через 2 недели мышей случайным образом распределили на экспериментальную и контрольную группы и вводили им внутривенно по 10×10^6 аутологичных CD45 Δ CAR45 Т клеток, CD45 Δ CAR19 Т клеток или CD45 Δ 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. Статистический анализ

Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, США). Графическое отображение статистических показателей на рисунках включает в себя средние значения \pm стандартное отклонение. Все эксперименты выполнены не менее чем в трех повторях, если не указано иное. Результаты обрабатывали с помощью двустороннего непарного *t*-критерия Стьюдента, кривые выживаемости строили с помощью метода Каплана-Майера. Статистически значимой разницы между исследуемыми группами была при $p < 0.05$. Обозначения на всех рисунках: ns – $p \geq 0.05$, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, **** – $p < 0.0001$.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Введение

В работе была поставлена цель создать подходы адоптивной иммунотерапии, основанные на таргетировании лейкоцитарного антигена (CD45) и его изоформ для клеточной иммунотерапии гематологических онкологических заболеваний и кондиционирования пациентов перед трансплантацией костного мозга. Во-первых, стояла задача создать нокаутные по CD45 (CD45^Δ) CAR45 Т клетки и CD45^Δ CAR45 НК клетки, которые можно использовать как для кондиционирования пациентов, так и для лечения онкогематологии. Во-вторых, исследовать терапевтический потенциал аллогенных CAR19 Тm клеток, полученных из Т клеток памяти здоровых гаплоидентичных доноров, на пациентах и сравнить CAR19 Тm клетки с классическими CAR19 Т клетками в *in vitro* и *ex vivo* экспериментах.

При выполнении работы нами были созданы новые экспериментальные модели и оригинальные методики для экспериментов *in vitro* и *in vivo*, которые позволили успешно выполнить поставленные задачи.

4.2. Получение, оценка функциональности и терапевтического потенциала CD45^Δ CAR45 Т клеток и CD45^Δ CAR45 НК клеток

4.2.1. Создание CD45^Δ Т клеток

Чтобы создать устойчивые к аутоксичности CAR Т клетки специфичные к CD45, использовали систему CRISPR/Cas9 для нокаута гена *PTPRC*, кодирующего CD45. Cas9 посредством направляющих гидовых РНК (gRNA, guide RNA) вносит двуцепочечные разрывы в последовательность гена, которые клетка восстанавливает случайным образом, удаляя или добавляя нуклеотиды. В подавляющем большинстве случаев это сдвигает рамку считывания и приводит к возникновению преждевременных стоп-кодона в транскрибируемой мРНК. В

результате нарушается или прекращается трансляция функционального белка. С помощью алгоритмов CRISPOR (Tefor Infrastructure, Франция) были подобраны последовательности нескольких специфичных gRNA к гену *PTPRC*:

- gRNA1: GGATTTGTGGCTTAAACTCT
- gRNA2: GGGTTTAAGCCACAAATACA
- gRNA3: GGCACACTTATACTCATGTT

После синтеза gRNA и получения комплексов с Cas9 их доставили в Т клетки с помощью нуклеофекции на приборе 4D-Nucleofector (Lonza, Швейцария) и оценили эффективность нокаута гена *PTPRC* с помощью анализа уровня поверхностного CD45 методом проточной цитофлуориметрии окрашенных специфическими к CD45 антителами клеток (Рисунок 15).

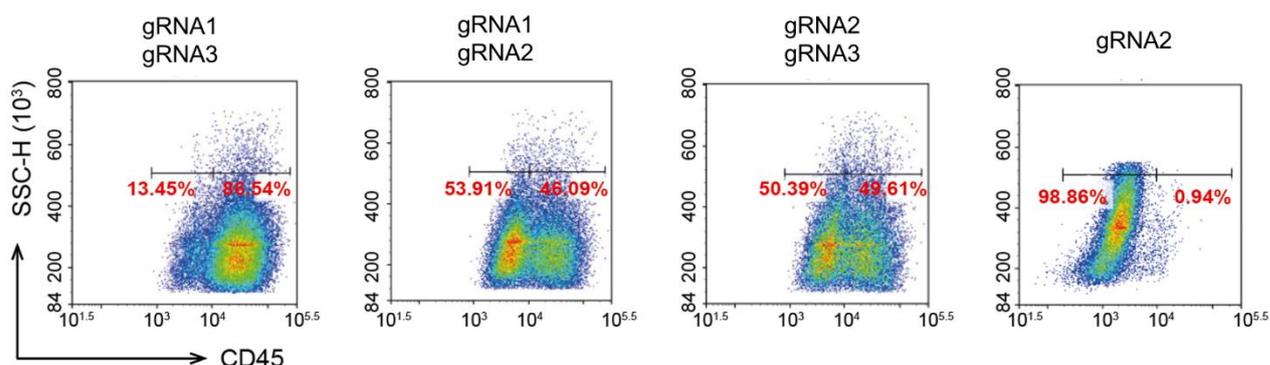


Рисунок 15 – Потеря поверхностного CD45 вследствие нокаута гена *PTPRC* в Т клетках. После нуклеофекции комплексами gRNA-Cas9 (через 4 дня) Т клетки были окрашены флуоресцентно меченными МкАТ к CD45 и проанализированы с помощью проточной цитофлуориметрии.

Использовали комбинации гидовых РНК, либо только gRNA2.

Результаты окрашивания показывают, что gRNA2 к экзону 1 наиболее эффективна для нокаута. Эффективность нокаута гена *PTPRC* дополнительно подтвердили методами конфокальной микроскопии окрашенных антителами фиксированных клеток (Рисунок 16А) и методом вестерн-блоттинга (Рисунок 16Б). Помимо этого, участок гена *PTPRC*, в который Cas9 внесла двуцепочечный разрыв, секвенировали по Сэнгеру (Рисунок 16В).

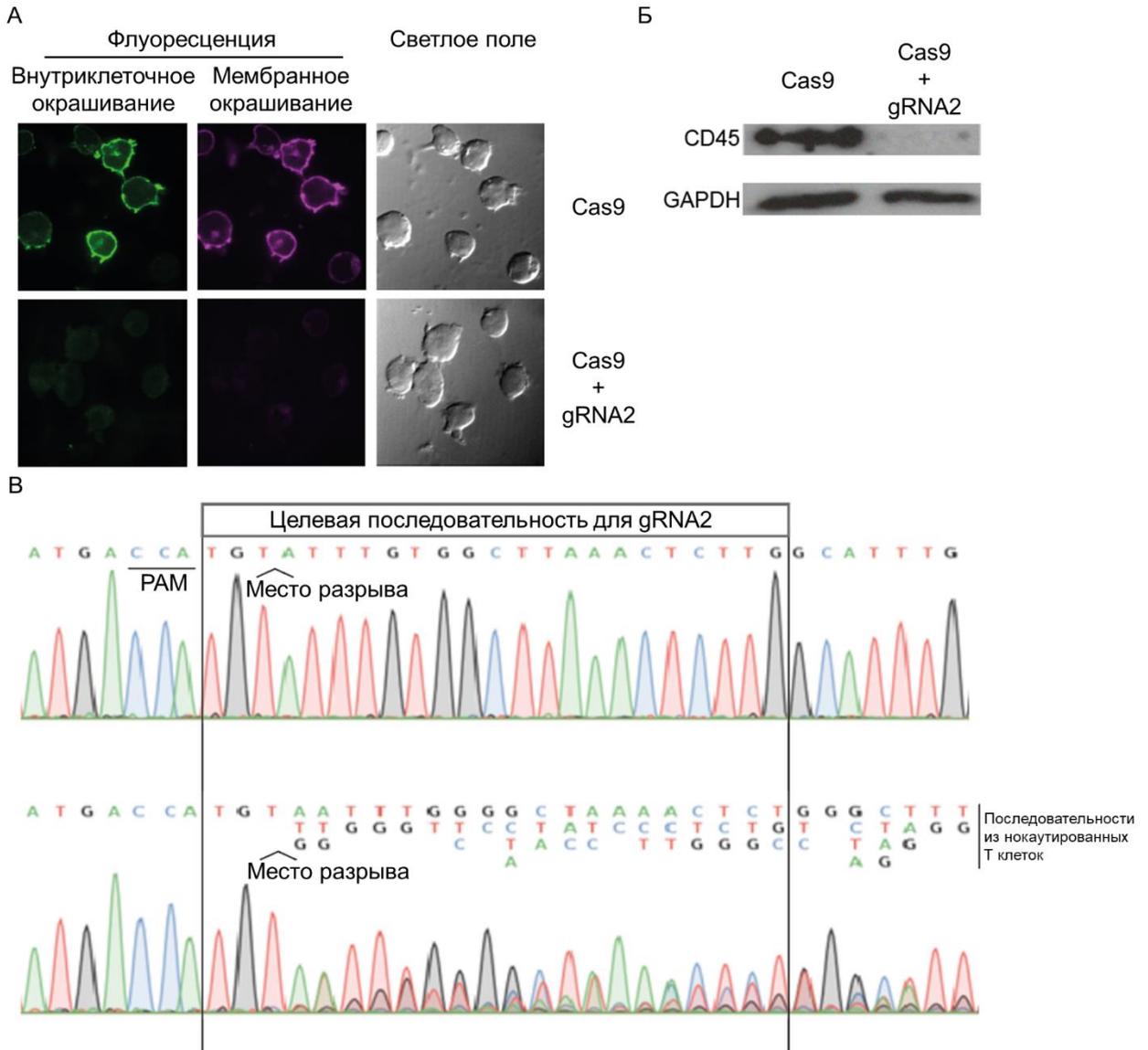


Рисунок 16 – Анализ уровня CD45 на поверхности Т клеток и общего уровня CD45 в клетках после нокаута гена *PTPRC*, а также изменений в геномной ДНК с помощью секвенирования; А – конфокальная микроскопия; Б – вестерн-блоттинг; В – секвенирование по Сэнгеру; PAM (protospacer adjacent motif, на рисунке обозначена комплементарная PAM последовательность).

Результаты проведенных экспериментов подтверждают уменьшение количества CD45 в Т клетках после нокаута ниже уровня детекции как с помощью вестерн-блоттинга, так и с помощью флуоресцентно меченых антител, а также изменение последовательности ДНК гена *PTPRC* в месте разрыва.

Доля нокаутных по CD45 клеток зависит от донора Т клеток, но в среднем эффективность нокаута не менее 85% (Рисунок 17А), при этом Т клетки сохраняют высокую жизнеспособность (Рисунок 17Б).

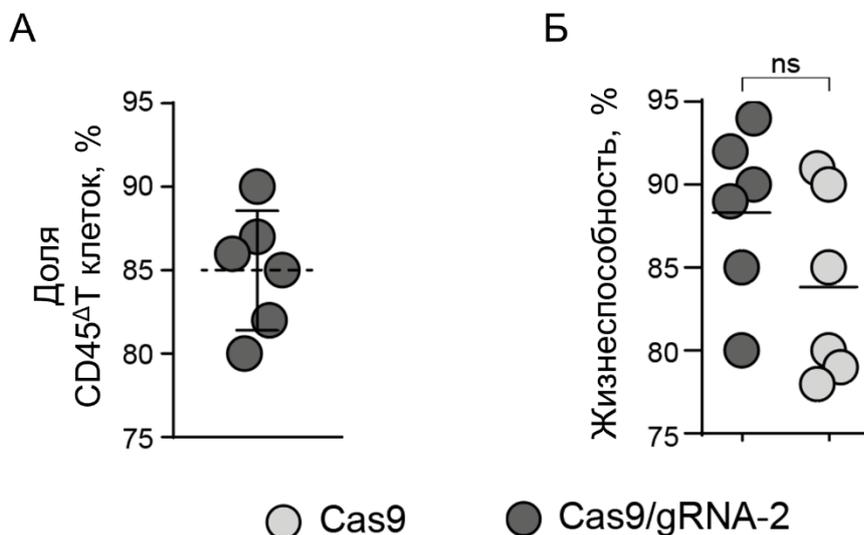


Рисунок 17 – Анализ Т клеток после нокаута; А – процент нокаута (оценивали методом проточной цитофлуориметрии); Б – жизнеспособность нокаутных по CD45 и контрольных клеток (оценивали на счетчике клеток с помощью трипанового синего)

Нокаут сохраняется в течение как минимум 4 недель после нуклеофекции, согласно результатам проточной цитофлуориметрии, что говорит об отсутствии селективного преимущества у Т клеток с нормальным уровнем CD45 в условиях культивирования (Рисунок 18).

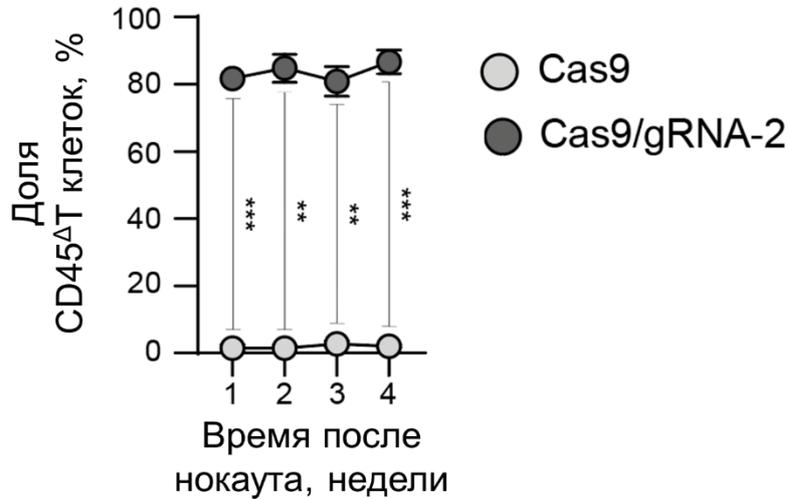


Рисунок 18 – Анализ динамики доли нокаутных по CD45 T клеток с течением времени после нуклеофекции со смесью Cas9 и Cas9+gRNA2 (проводили методом проточной цитофлуориметрии); звездочки показывают значимые отличия в процентном содержании нокаутных по CD45 T лимфоцитов

Так как в результате геномного редактирования могут быть дополнительно затронуты иные области генома T клеток, в том числе ответственные за контроль пролиферации и других важных клеточных функций, был проведен анализ неспецифического расщепления геномной ДНК Cas9 в ходе проведения нокаута CD45. Для этого проанализировали фрагменты генома T клеток после нокаута с помощью высокопроизводительного секвенирования. Из возможных 183 сайтов неспецифической активности Cas9, идентифицированных *in silico*, были отобраны сайты с максимальными значениями (≥ 0.21) CFD, характеризующими наибольшую вероятность ошибок. В результате, мы обнаружили неспецифическую активность Cas9 только в гене белка тромбоспондина *THSD4*, который обладает самым высоким CFD=0.69 (

Таблица 6 приложения Б). Данный белок играет роль в сосудистых заболеваниях, но не обнаружен в иммунных клетках и, соответственно, его отсутствие вряд ли сказывается на их пролиферации [134].

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

4.2.2. Редактирование гена CD45 не приводит к нарушению функций Т клеток

Литературные данные не позволяют однозначно утверждать, что функция Т клеток не пострадает при удалении CD45, особенно, если принять во внимание его важную роль в осуществлении передачи сигнала при стимуляции через ТКР. Поэтому были проведены эксперименты с CD45^Δ Т клетками, направленные на оценку их активности в тестах *in vitro*. Для этого инкубировали CD45^Δ Т клетки с CD19-позитивными клетками Ramos ffLuc/GFP (таргетные клетки) в присутствии биспецифического активатора Т клеток (BiTE, bispecific T cell engager) блинатумомаба (Рисунок 19А). Блинатумомаб связывает CD19 на опухолевой клетке и CD3ε на Т лимфоцитах, активируя ТКР [135]. Мы сравнили уровень цитотоксичности (Рисунок 19Б) CD45^Δ Т клеток и их способность к секреции провоспалительных цитокинов (ИЛ-2 и ИФН-γ) (Рисунок 19В), по сравнению с контрольными Т клетками с нормальным уровнем CD45. По убыванию количества GFP-позитивных таргетных клеток мы определяли цитотоксичность методом проточной цитофлуориметрии. Уровень выделяемых в среду провоспалительных цитокинов определяли с помощью ИФА.

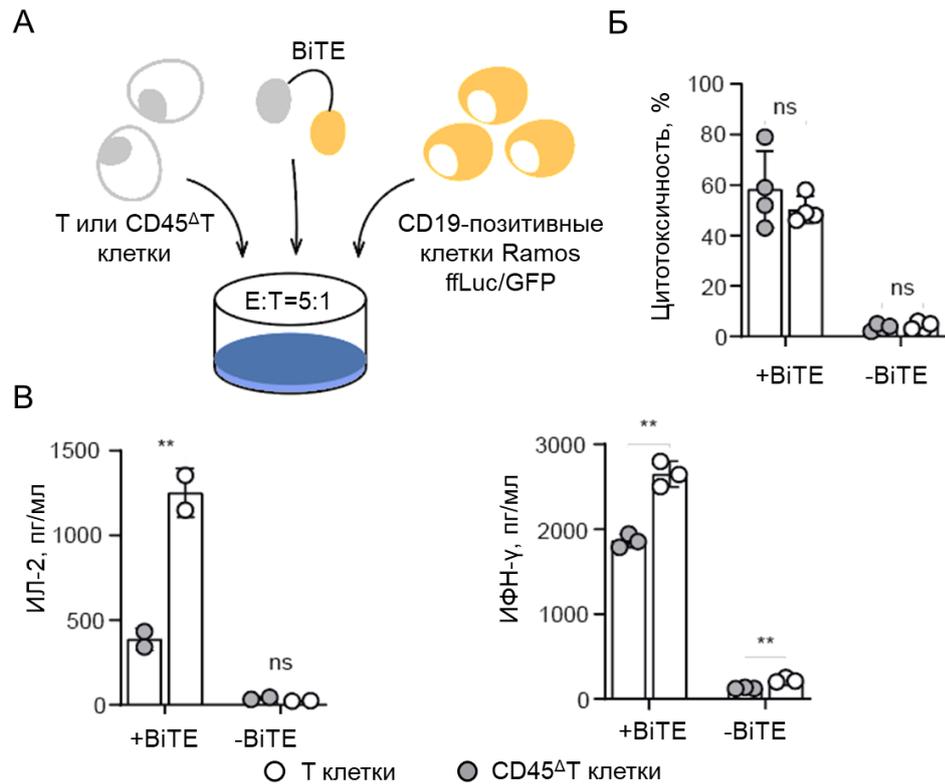


Рисунок 19 – Сравнительный анализ активности, опосредованной ТКР, CD45^Δ Т клеток и обычных Т лимфоцитов в отношении опухолевых клеток, методами проточной цитофлуориметрии и ИФА; А – общая схема эксперимента; Б – цитотоксичность; В – секреция провоспалительных цитокинов; BiTE – блинатумомаб; +/-BiTE – добавление/отсутствие BiTE; звездочки показывают значимые отличия в секреции провоспалительных цитокинов между CD45^Δ Т клетками и обычными Т клетками

Как видно из результатов, цитотоксическая активность сохраняется независимо от наличия CD45, выделение ИЛ-2 и ИФН-γ в отсутствие CD45 уменьшается.

Кроме того, мы инкубировали Т клетки со смесью иономицина и форболового эфира, которые активируют транскрипционные факторы NFAT и NFκB, не требуя участия ТКР [136] (Рисунок 20). В стимулированных клетках оценивали продукцию провоспалительных цитокинов с помощью внутриклеточного окрашивания флуоресцентно меченными МкАТ к соответствующим цитокинам, результаты окрашивания анализировали методом проточной цитофлуориметрии.

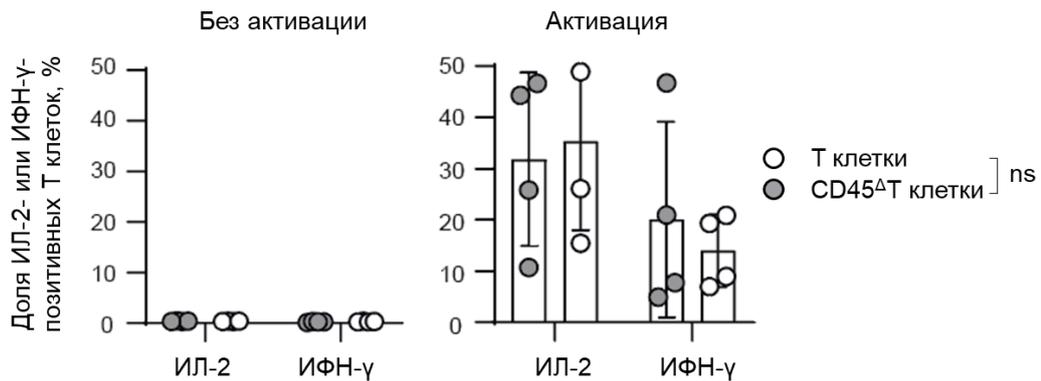


Рисунок 20 – Сравнительный анализ секреции провоспалительных цитокинов, опосредованной внутриклеточными участниками сигнальных каскадов в обход ТКР, CD45 Δ Т клеток и обычных Т лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии

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 Δ 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.

На этом этапе мы показали, что удаление CD45 практически не влияет на цитотоксический потенциал Т лимфоцитов, по крайней мере, в использованных нами тестах.

4.2.3. Нокаут гена CD45 не нарушает цитотоксическую функцию CD45 Δ CAR19 Т клеток *in vitro*

Для оценки того, как удаление CD45 влияет на CAR Т клетки, в качестве мишени мы выбрали антиген CD19. Генетическая конструкция CAR19 для таргетирования CD19 и модификации Т лимфоцитов была получена ранее в лаборатории [137, 138].

Согласно методикам, описанным в главе Методы работы с эукариотическими клетками, были получены ненокаутные по CD45 CAR19 Т клетки и CD45^Δ CAR19 Т клетки (Рисунок 21).

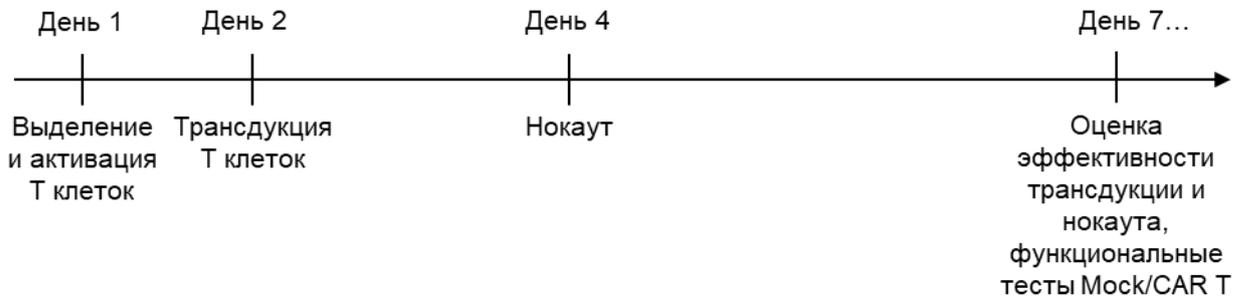


Рисунок 21 – Схема получения CD45^Δ CAR19 Т клеток

Через несколько дней после нокаута нетрансдуцированные (Mock) Т клетки и CAR Т клетки окрашивали флуоресцентно мечеными МкАТ к CD45 и CAR19 и оценивали эффективность нокаута и трансдукции методом проточной цитофлуориметрии (Рисунок 22).

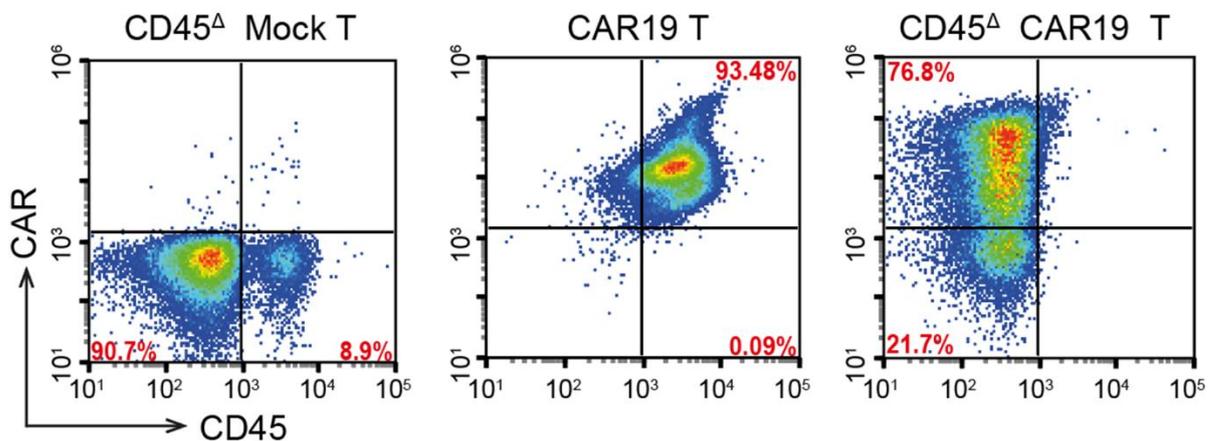


Рисунок 22 – Окрашивание Mock Т клеток и CAR Т клеток флуоресцентно мечеными МкАТ к CD45 и CAR19 на 7 день эксперимента и анализ экспрессии обозначенных маркеров методом проточной цитофлуориметрии

Как видно из результатов окрашивания, разработанный протокол позволяет получать CD45^Δ CAR19 Т клетки с высоким процентом нокаута и трансдукции.

После получения мы культивировали CAR Т лимфоциты в течение 2-3 недель (Рисунок 23) и анализировали стабильность популяции CD45^Δ CAR19 Т клеток.

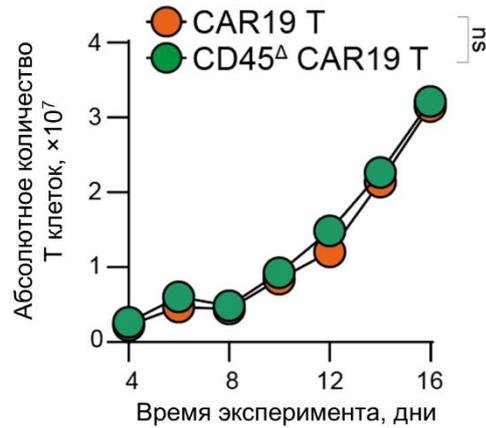


Рисунок 23 – Анализ экспансии CD45^Δ CAR19 Т клеток после получения (подсчет проводили на счетчике клеток с помощью трипанового синего)

Анализ экспансии показывает, что CD45^Δ CAR19 Т клетки не отличаются от традиционных CAR19 Т клеток, и их можно успешно наработать *ex vivo*.

Далее мы сравнили цитотоксичность (Рисунок 24А) и продукцию провоспалительных цитокинов (ИЛ-2 и ИФН-γ) (Рисунок 24Б, В) CAR19 Т клеток и CD45^Δ CAR19 Т клеток в присутствии CD19-позитивных опухолевых клеток линий Nalm-6 и Jeko-1, модифицированных ffLuc/GFP для детекции GFP-позитивных событий методом проточной цитофлуориметрии.

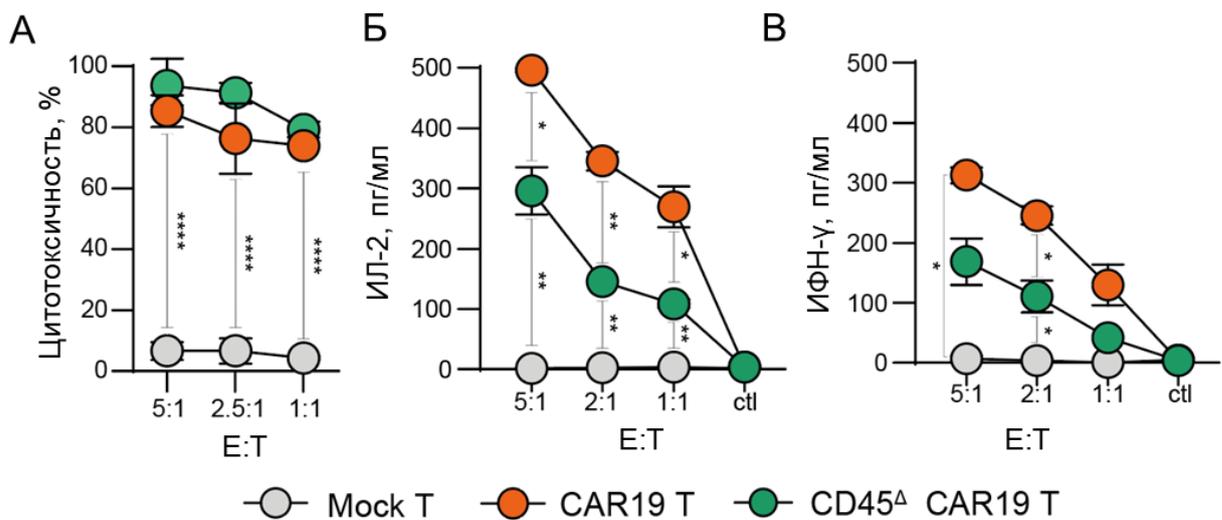


Рисунок 24 – Сравнительный анализ активности CD45^Δ CAR19 Т клеток и CAR19 Т клеток в присутствии CD19-позитивных клеток Jeko-1 методами проточной цитофлуориметрии и ИФА;

А – цитотоксичность; Б – продукция ИЛ-2; В – продукция ИФН-γ; ctrl – контрольные точки без таргетных клеток Jeko-1; звездочки показывают значимые отличия в цитотоксичности между контрольными Mock Т клетками и эффективно лизирующими таргетные клетки CD45^Δ CAR19 Т клетками и CAR19 Т клетками, а так же значимые отличия в секреции провоспалительных цитокинов между CD45^Δ CAR19 Т клетками и CAR19 Т клетками

Инкубация с Jeko-1 и последующий подсчет таргетных 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.

Цитотоксичность в отношении CD19-позитивных клеток Nalm-6 (Рисунок 25) тоже не меняется при удалении CD45.

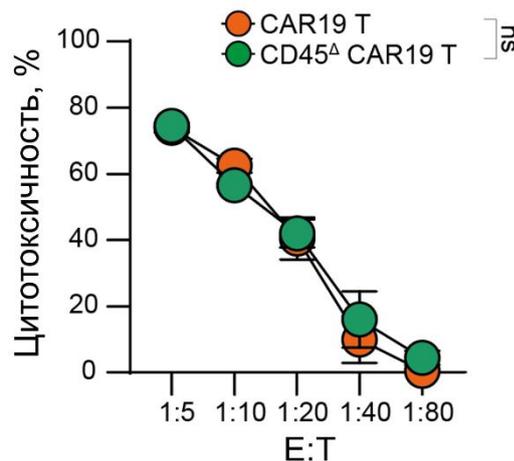


Рисунок 25 – Анализ цитотоксичности CD45^Δ CAR19 Т клеток в отношении CD19-позитивных клеток Nalm-6 методом проточной цитофлуориметрии

Таким образом, результаты *in vitro* экспериментов показали, что после удаления CD45: цитотоксическая активность CAR Т клеток сохраняется неизменной независимо от наличия CD45, а выделение ИЛ-2 и ИФН-γ в отсутствие CD45 уменьшается.

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

Далее мы анализировали способность CD45^Δ CAR19 Т клеток в сравнении с обычными CAR19 Т клетками элиминировать опухолевые клетки *in vivo*. Для создания релевантной животной модели В клеточной опухоли [137] CD19-позитивные клетки Nalm-6 ffLuc/GFP внутривенно прививали иммунодефицитным мышам линии *NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{em1Smoc}* (NCG). Через неделю животных случайным образом делили на группы и внутривенно вводили контрольные Mock Т клетки, CAR19 Т клетки, либо CD45^Δ CAR19 Т клетки. Динамику развития опухоли визуализировали методом прижизненной детекции люминесцентного сигнала (Рисунок 26А, Б), также наблюдали за выживаемостью мышей в долговременном периоде (Рисунок 26В).

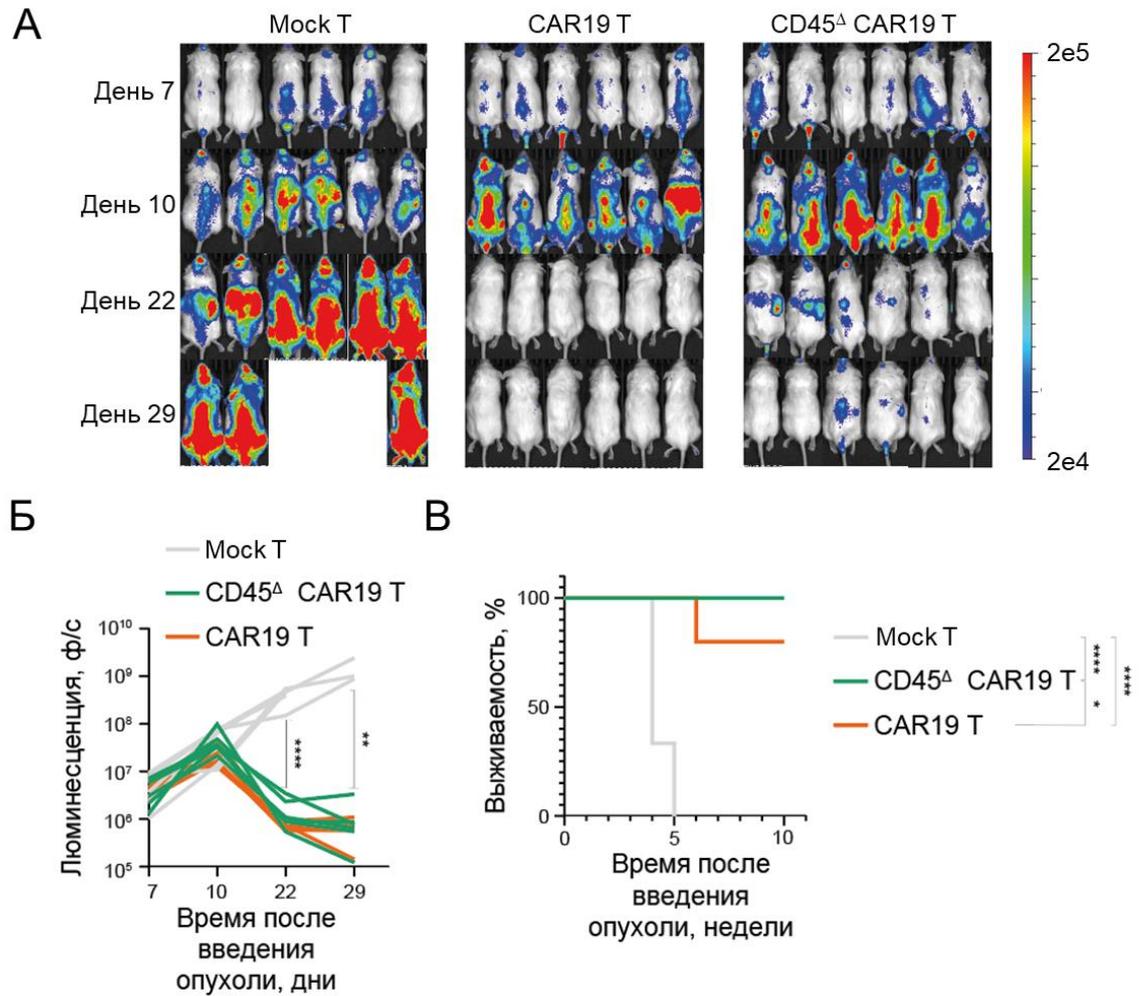


Рисунок 26 – Сравнительный анализ элиминации CD19-позитивной опухоли CD45^Δ CAR19 T клетками и CAR19 T клетками *in vivo*; А – визуализация развития опухоли; Б – динамика люминесцентного сигнала в течение эксперимента; В – выживаемость мышей по группам; звездочки показывают значимые отличия в динамике опухолевого сигнала и выживаемости мышей между группами животных с терапией CAR T клетками (при этом лечение CD45^Δ CAR19 T клетками и CAR19 T клетками дает сходный результат по эффективной элиминации опухолей) и терапией контрольными Mock T клетками

Из результатов анализа видно, что CD45^Δ CAR19 T клетки эффективно элиминируют В клеточные опухоли и способствуют лучшей выживаемости лабораторных животных. Более того, терапия CD45^Δ CAR19 T клетками может быть более безопасной для пациентов с точки зрения побочных эффектов из-за

более низкой продукции провоспалительных цитокинов, но для подтверждения этого необходимы клинические исследования.

Подтвердив сохранение функциональной активности CAR19 Т клеток после нокаута гена, кодирующего CD45, мы приступили к созданию CD45^Δ CAR45 Т клеток.

4.2.5. Создание CD45^Δ CAR45 Т клеток

В литературе описан клон МкАТ ВС8 ко всем известным изоформам человеческого CD45 [139]. Клон ВС8 исследован в доклинических [140-143] и клинических (#NCT00002554, #NCT00003868, #NCT00003870, #NCT00005940, #NCT00008177, #NCT00988715, #NCT01300572, #NCT01503242, #NCT01921387 – clinicaltrials.gov) исследованиях, и в виде терапевтического антитела, и в виде конъюгатов с различными химио- и радиотерапевтическими препаратами, доказан высокий терапевтический потенциал антитела ВС8. Для создания ВС8 CAR 3-го поколения (CAR45) (Рисунок 27) в данной работе использовали одноцепочечный переменный фрагмент из этого клона.

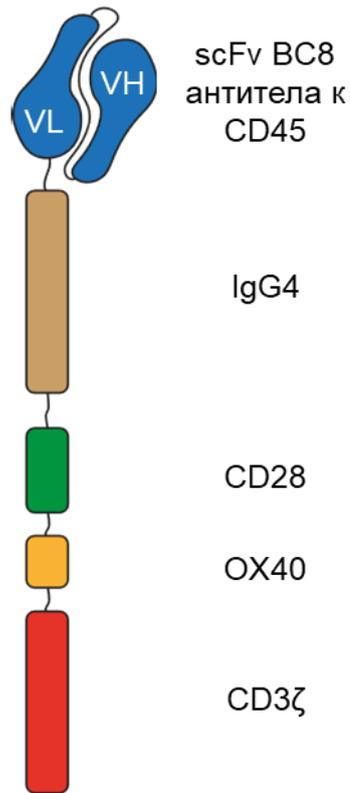


Рисунок 27 – Схема CAR45; scFv (single-chain variable fragment) – одноцепочечный переменный фрагмент; VH (variable heavy chain) – переменный фрагмент тяжелой цепи антитела; VL (variable light chain) – переменный фрагмент легкой цепи антитела; IgG4 (Immunoglobulin G4 hinge) – шарнирная область CAR, которая содержит участок последовательности иммуноглобулина G4 человека; CD28 – трансмембранная и внутриклеточная часть человеческого CD28, которые формируют трансмембранный и первый ко-стимулирующий домены CAR; OX40 – внутриклеточная часть человеческого CD134, которая формирует второй ко-стимулирующий домен CAR; CD3 ζ – внутриклеточная часть человеческого CD3 ζ , которая формирует домен активации CAR; лентивирусный вектор, кодирующий CAR45, показан на Рисунок 53 приложения В

При получении CD45^A CAR45 Т клеток стало понятно, что лимфоциты с BC8 CAR стремительно теряют жизнеспособность (Рисунок 28).

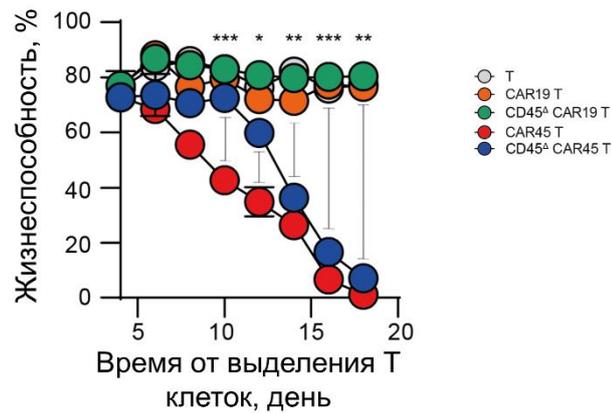


Рисунок 28 – Сравнительный анализ жизнеспособности CD45 Δ CAR45 T клеток, CAR45 T клеток и контрольных нокаутных и ненюкаутных по CD45 CAR19 T клеток и Mock T клеток в процессе культивирования; звездочки показывают значимые отличия в уровне жизнеспособности между CD45 Δ CAR45 T клетками и CAR45 T клетками в начале периода культивации, а также между CD45 Δ CAR45 T клетками и контрольными CAR19 T клетками ближе к концу культивации

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. Недавно была опубликована статья о CAR T клетках к антигену T лимфоцитов CD7, которые также могут убивать друг друга. В процессе *ex vivo* экспансии CAR7 T клеток в культуральную среду добавляли обратимый ингибитор тирозиновых киназ широкого спектра действия дазатиниб [144]. Основываясь на литературных данных о дазатинибе, мы протестировали несколько концентраций этого вещества (25, 50, 100 нМ) в процессе получения CD45 Δ CAR45 T клеток (Рисунок 29), чтобы попытаться защитить их от “братоубийства” путем снижения активации.

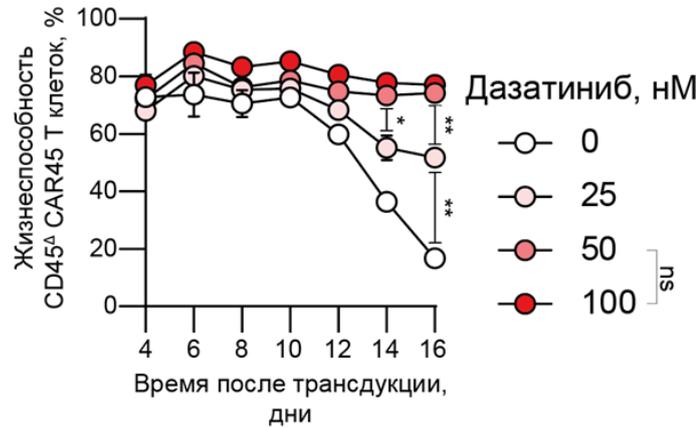


Рисунок 29 – Сравнительный анализ жизнеспособности CD45 Δ CAR45 Т клеток при разных концентрациях дазатиниба (оценка производилась на счетчике клеток с помощью трипанового синего); звездочки показывают значимые отличия в уровне жизнеспособности лимфоцитов, культивируемых в среде с 25, 50 или 100 нМ дазатиниба относительно меньших концентраций на поздних стадиях культивации

Как видно из результатов, оптимальная концентрация дазатиниба для наработки CD45 Δ CAR45 Т клеток – 50 нМ. Действительно, при таких условиях CD45 Δ CAR45 Т клетки успешно пролиферируют и сохраняют жизнеспособность (Рисунок 30).

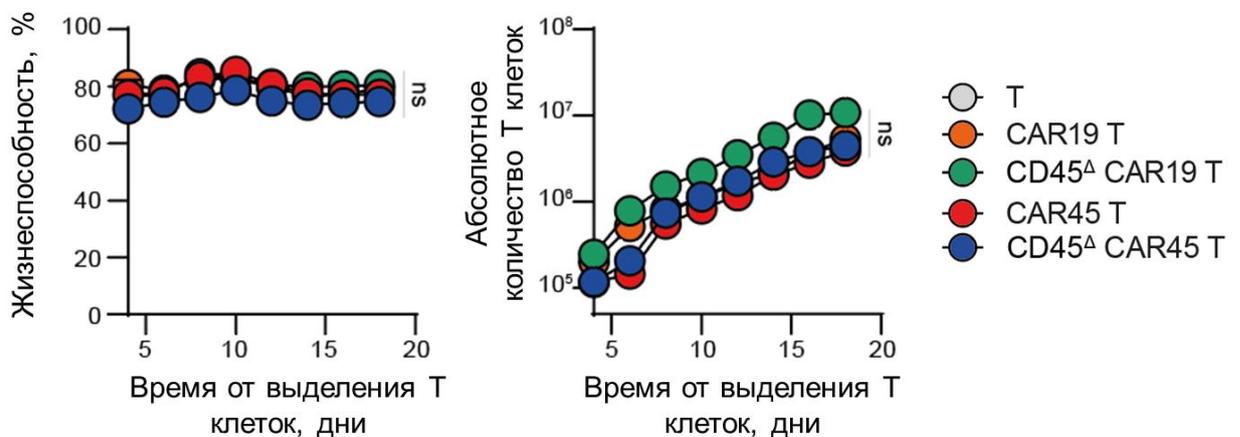


Рисунок 30 – Сравнительный анализ жизнеспособности и динамики количества CD45 Δ CAR45 Т клеток, CAR45 Т клеток и контрольных нокаутных и ненокаутных по CD45 CAR19 Т клеток и Mock Т клеток в присутствии 50 нМ дазатиниба

Дазатиниб никак не вредит экспансии различных Т клеток, что соотносится с данными литературы.

Итоговая схема получения CD45^Δ CAR45 Т клеток представлена на рисунке ниже (Рисунок 31).

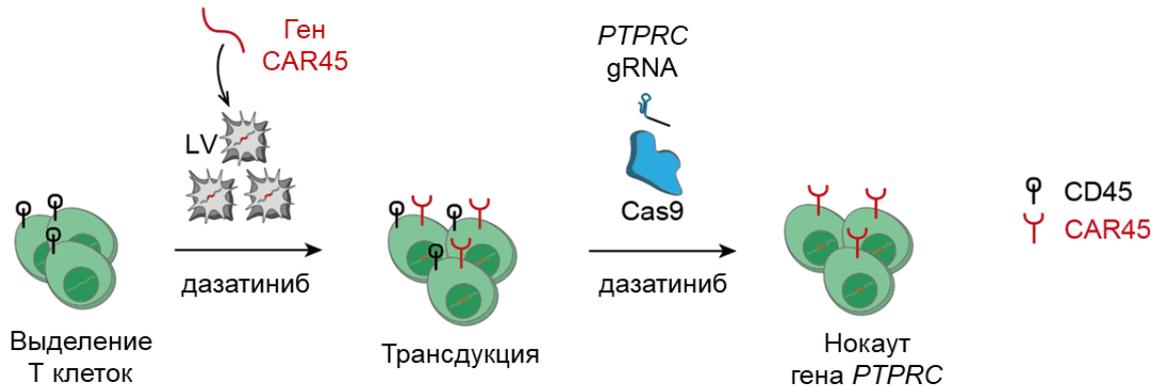


Рисунок 31 – Схема получения CD45^Δ CAR45 Т клеток; LV – лентивирусы

Начиная с трансдукции, на протяжении всего процесса экспансии в культуральную среду добавляется дазатиниб. Перед постановкой экспериментов эффекторные клетки помещаются в среду без дазатиниба.

Методом проточной цитофлуориметрии мы показали, что процент CAR-позитивных и CD45-негативных Т лимфоцитов увеличивается со временем (Рисунок 32).

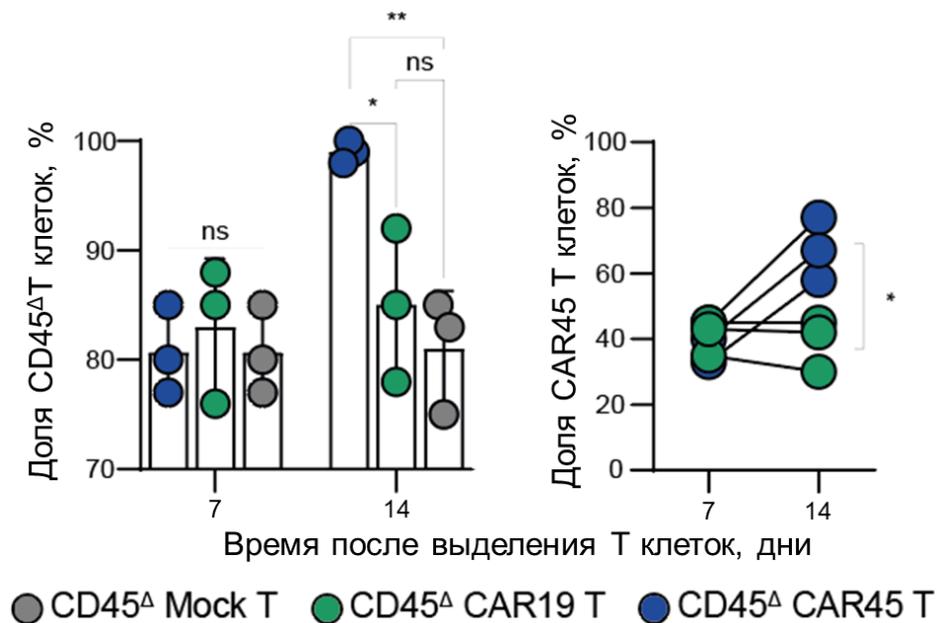


Рисунок 32 – Сравнительный анализ динамики процентного содержания CAR-позитивной и CD45-негативной Т клеточных популяций в процессе экспансии (окрашивали клетки флуоресцентно мечеными МкАТ к соответствующим маркерам и анализировали методом

проточной цитофлуориметрии); звездочки показывают значимые отличия в процентном содержании популяций между CD45^Δ CAR45 Т клетками и контрольными CD45^Δ CAR19 Т клетками

Разделение CAR-позитивных и CD45-негативных популяций также наглядно показано на графиках с проточного цитометра (Рисунок 33).

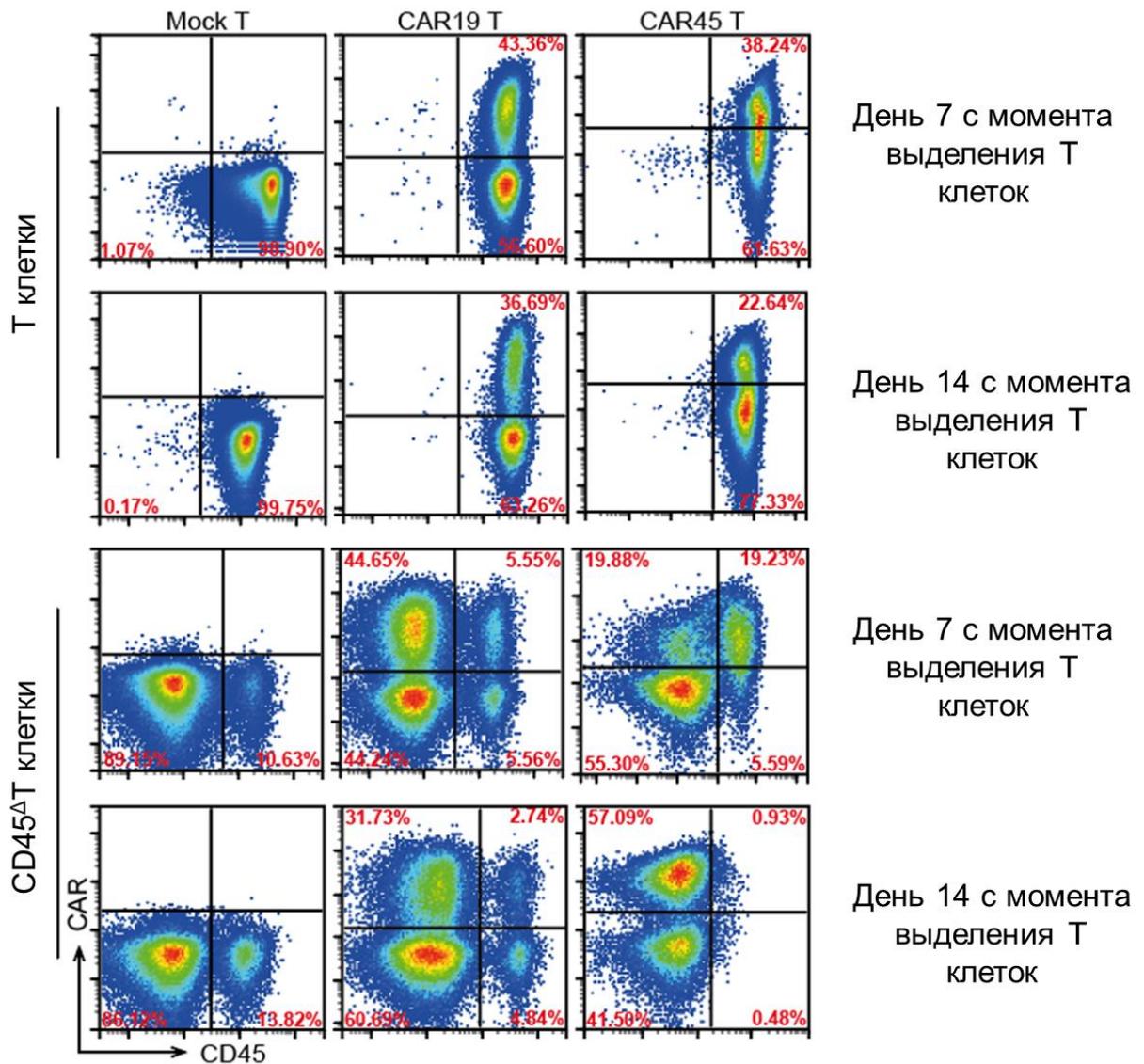


Рисунок 33 – Сравнительный анализ Mock Т клеток и CAR Т клеток по маркерам CAR и CD45 в разные временные точки экспансии с помощью окрашивания флуоресцентно мечеными МкАТ к соответствующим маркерам и последующей детекции методом проточной цитофлуориметрии

Полученные результаты показали, что в отличие от CD45^Δ CAR19 Т клеток, в процессе культивации CD45^Δ CAR45 Т клеток в присутствии дазатиниба популяция CD45-негативных CAR-позитивных Т лимфоцитов начинает превалировать. Это

значит, что концентрация дазатиниба 50 нМ создает такие условия экспансии CD45^Δ CAR45 T клеток, которые позволяют им продержаться до момента полноценного исчезновения CD45 с поверхности клеток, после чего лизировать оставшуюся после нокаута популяцию CD45-позитивных T лимфоцитов.

Фенотипически CD45^Δ CAR45 T клетки в основном представляют собой T_{CM} и T_{EM} лимфоциты, что обозначено на графике ниже (Рисунок 34). Для определения фенотипа мы использовали иммунофенотипирование. Так как на нокаутных по CD45 лимфоцитах отсутствовали используемые чаще всего маркеры фенотипа – изоформы CD45 – CD45RA или CD45RO, мы использовали флуоресцентно меченные МкАТ к другим характерным маркерам: CD62L, CD27 и CD95.

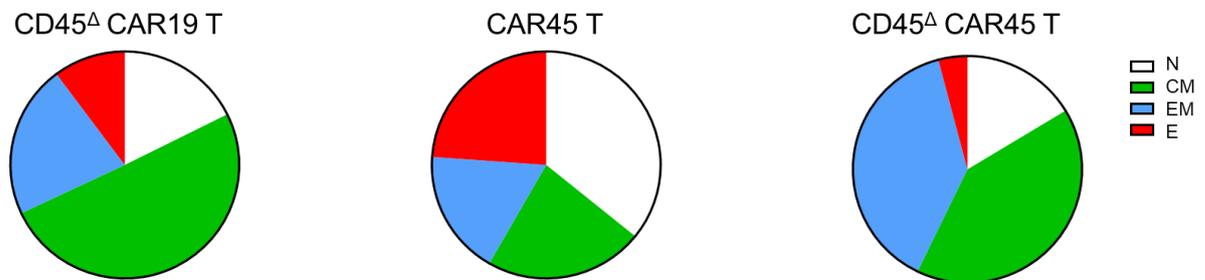


Рисунок 34 – Сравнительный анализ фенотипа CD45^Δ CAR45 T клеток, CAR45 T клеток и CD45^Δ CAR19 T клеток на 14 день экспансии; популяции T лимфоцитов: N – наивные (CD62L⁺CD27^{hi}CD95⁻), CM – центральной памяти (CD62L⁺CD27^{hi}CD95⁺), EM – эффекторной памяти (CD62L⁻CD27^{lo}CD95⁺), E – эффекторные, или терминально дифференцированные (CD62L⁻CD27⁻CD95⁺)

Данные показывают, что экспансия CD45^Δ CAR45 T клеток делает их более дифференцированными в сравнении с CD45^Δ CAR19 T клетками (судя по соотношению T_{CM} и T_{EM} популяций). При этом CD45^Δ CAR45 T клетки выгодно и ожидаемо отличаются от CAR45 T клеток, значительная доля которых – это терминально дифференцированные T_E лимфоциты.

Разработанный протокол позволяет получать жизнеспособные CD45^Δ CAR45 T клетки, которые в присутствии дазатиниба обогащаются по целевой популяции и сохраняют менее дифференцированный фенотип, чем ненюкаутные по CD45 CAR45 T клетки.

4.2.6. $CD45^{\Delta}$ CAR45 T клетки эффективнее CAR45 T клеток лизируют $CD45$ -позитивные клетки крови человека *in vitro*

Для того, чтобы позднее протестировать активность $CD45^{\Delta}$ CAR45 T клеток на панели опухолевых клеток мы охарактеризовали несколько линий опухолевых клеток по маркерам $CD45$ и $CD19$ методом проточной цитофлуориметрии (Рисунок 35).

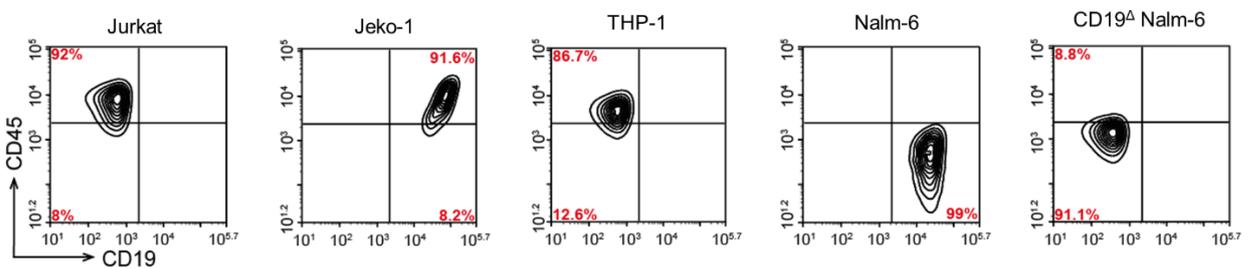


Рисунок 35 – Окрашивание целевых опухолевых клеток флуоресцентно мечеными мкАТ к $CD45$ и $CD19$ и анализ экспрессии этих маркеров методом проточной цитофлуориметрии; $CD19^{\Delta}$ – клетки, нокаутные по гену, кодирующему $CD19$

Среди них Jurkat, представляющие T клеточный лимфобластный лейкоз [145]; Jeko-1, представляющие мантийно-клеточную лимфому [146]; THP-1, представляющие миелоидный лейкоз [147]; а также обычные и нокаутные по гену $CD19$, кодирующему $CD19$ человека, ($CD19^{\Delta}$) Nalm-6, представляющие B клеточный лимфобластный лейкоз (B-ALL, B-cell acute lymphoblastic leukemia) [148]. Такое разнообразие целевых клеток подчеркнет широкий спектр терапевтической активности полученных $CD45^{\Delta}$ CAR45 T клеток в отношении различных гемопоэтических опухолей, а включение $CD45$ -негативных таргетов покажет, насколько специфична терапия полученными клетками. Мы модифицировали охарактеризованные по $CD45$ и $CD19$ клеточные линии ffLuc/GFP с помощью лентивирусной трансдукции, чтобы анализировать цитотоксичность CAR T.

Чтобы количественно оценить цитотоксичность CD45^Δ CAR45 Т клеток, мы использовали несколько методов. Во-первых – проточную цитофлуориметрию, детектирующую изменение количества GFP-позитивных таргетов (Рисунок 36).

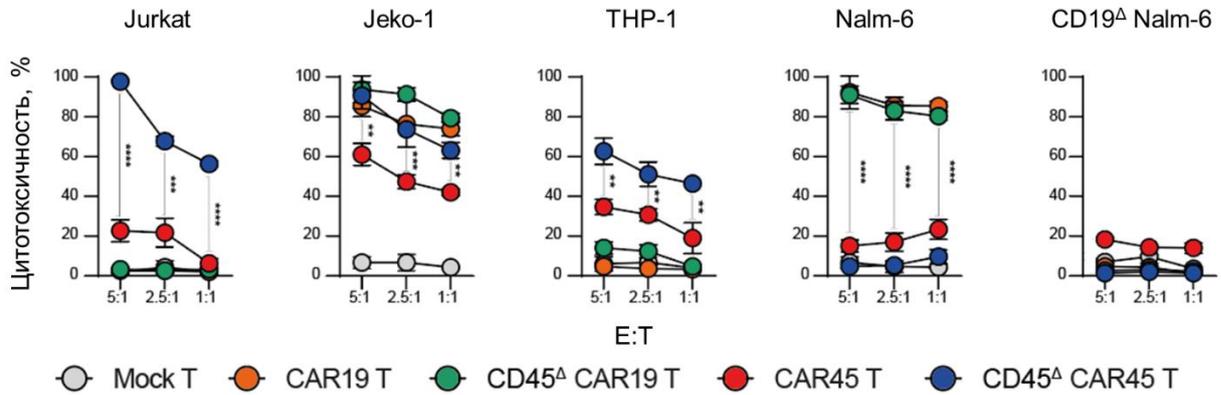


Рисунок 36 – Сравнительный анализ цитотоксичности CD45^Δ CAR45 Т клеток, CAR45 Т клеток и контрольных нокаутных и ненюкаутных по CD45 CAR19 Т клеток и Mock Т клеток в отношении разных опухолевых клеточных линий; звездочки показывают значимые отличия в уровне цитотоксичности CD45^Δ CAR45 Т клеток и CAR45 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

Результаты показывают, что из-за наличия CD45 на поверхности большинства опухолевых гемопоэтических клеток, 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. Кроме того, мы анализировали скорость лизиса таргетных клеток в реальном времени с помощью прибора Incucyte (Sartorius, Германия). Мы инкубировали CAR19/CAR45 Т и CD19/CD45-позитивные опухолевые клетки в течение 48 часов при низком соотношении эффекторных и таргетных клеток E:T=1:3 (Рисунок 37). Аналогично предыдущему методу, изменение во флуоресценции от таргетных клеток отражало динамику их количества во времени.

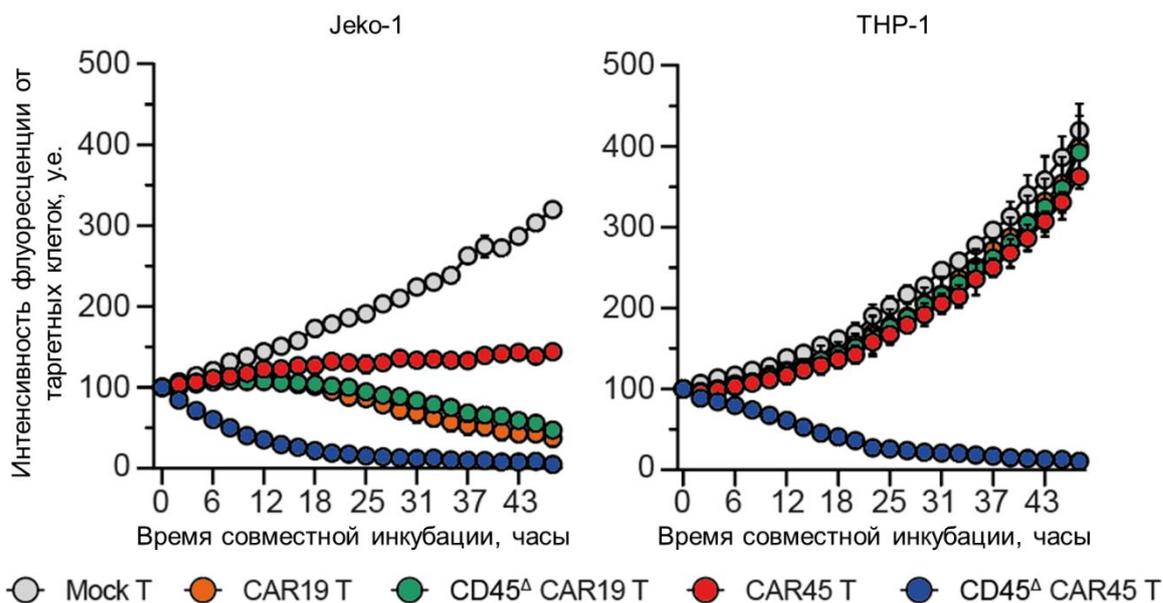


Рисунок 37 – Сравнительный анализ динамики цитотоксичности опухолевых клеток CD45 Δ CAR45 T клетками, CAR45 T клетками и контрольными нокаутными и ненюкаутными по CD45 CAR19 T клетками и Mock T клетками

Как показывают результаты, CD45 Δ CAR45 T клетки действуют даже быстрее, чем CAR19 T и CD45 Δ CAR19 T клетки в случае Jeko-1, экспрессирующих CD19 и CD45. Это интересная особенность несомненно является полезным дополнением, однако точные причины этого феномена необходимо дополнительно исследовать. При этом интересно было бы сравнить скорость лизиса целевых клеток CD45 Δ CAR45 T клетками и CAR T клетками к другим маркерам, например, миелоидным CD33, CD123.

В процессе анализа секреции провоспалительных цитокинов методом ИФА мы обнаружили, что ненюкаутные по CD45 CAR45 T клетки даже в отсутствие целевых клеток находятся в состоянии активации и вырабатывают ИЛ-2 и ИФН- γ (Рисунок 38).

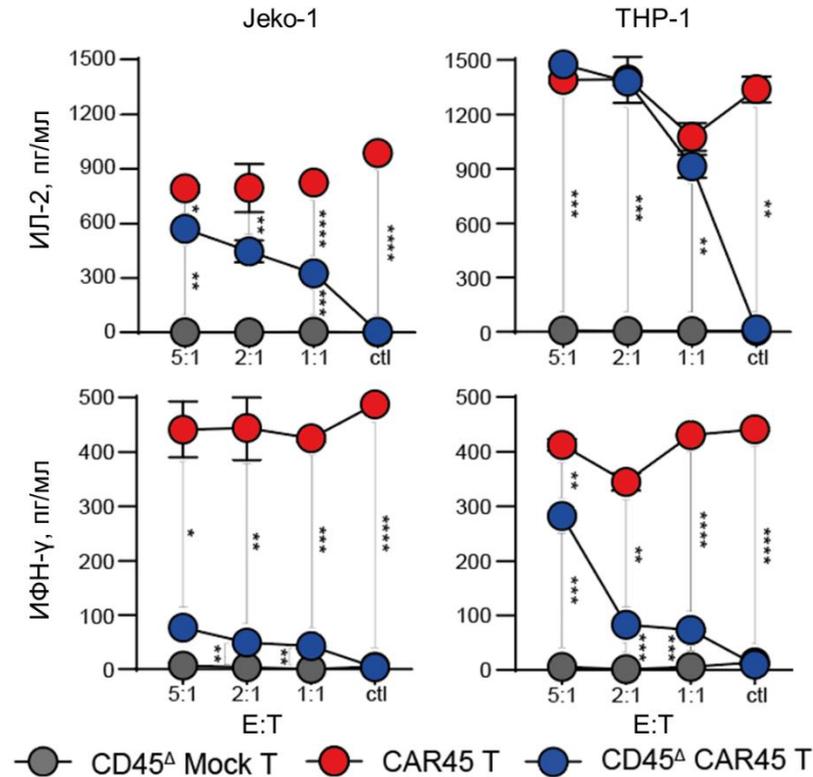


Рисунок 38 – Сравнительный анализ продукции провоспалительных цитокинов CD45^Δ CAR45 T клетками и CAR45 T клетками в присутствии различных таргетных опухолевых клеток; ctl – контрольные лунки без таргетных клеток; звездочки показывают значимые отличия в секреции цитокинов между CD45^Δ CAR45 T клетками и CAR45 T клетками, особенно в отсутствие опухолевых клеток

В то время как CD45^Δ CAR45 T клетки дозозависимо активируются только в присутствии таргетных клеток. Хотя количество цитокинов в некоторых случаях несколько снижено в сравнении с ненокаутными по CD45 CAR45 T клетками, что соотносится с предыдущими результатами.

Для оценки цитотоксичности CD45^Δ CAR45 T клеток в отношении незлокачественных гемопоэтических клеток, мы инкубировали исследуемые эффекторные клетки с аутологичными T клетками (Рисунок 39А) и РВМС (Рисунок 39Б).

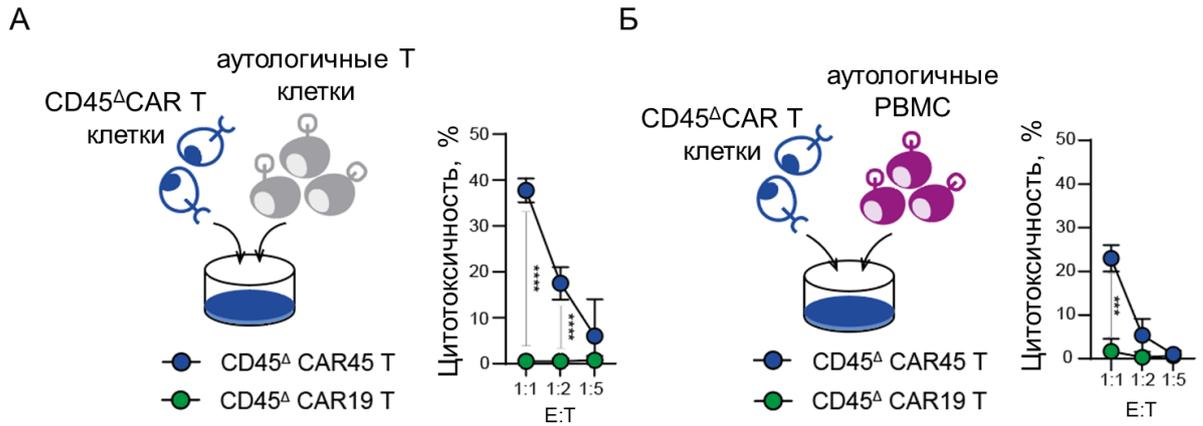


Рисунок 39 – Сравнительный анализ цитотоксичности CD45^Δ CAR45 Т клеток и CD45^Δ CAR19 Т клеток в отношении аутологичных гемопоэтических клеток; А – цитолиз Т клеток; Б – цитолиз PBMC; звездочки обозначают значимы различия между CD45^Δ CAR45 Т клетками и CD45^Δ CAR19 Т клетками, которые особенно выражены при наибольшем соотношении эффекторных (Е) и таргетных (Т) клеток

Чтобы оценить динамику уничтожения таргетных клеток, ежедневно в течение 3 дней детектировали уровень цитолиза PBMC CD45^Δ CAR45 Т клетками методом проточной цитофлуориметрии (Рисунок 40).

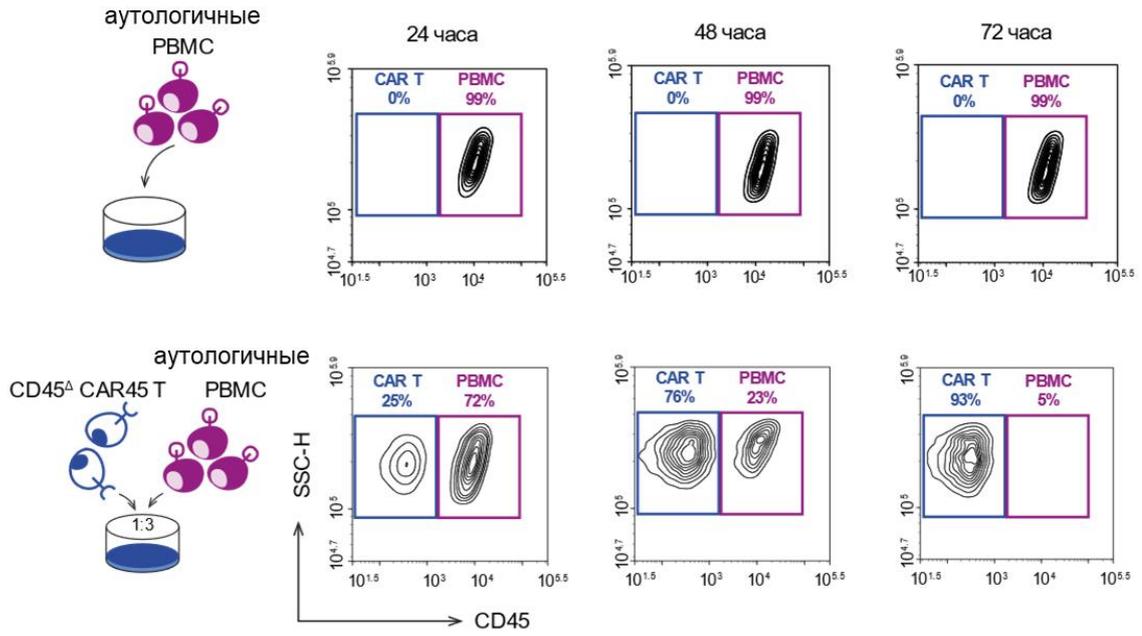


Рисунок 40 – Анализ цитолиза аутологичных PBMC CD45 Δ CAR45 T клетками

Сходным образом мы анализировали цитолиз аутологичных клеток костного мозга – более релевантной цели для демонстрации потенциала к элиминации гемопоэтических клеток (Рисунок 41).

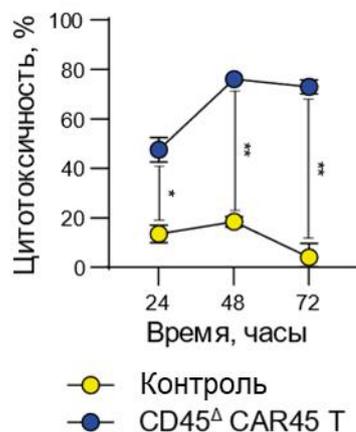


Рисунок 41 – Анализ цитотоксичности аутологичных клеток костного мозга (Т) CD45^Δ CAR45 Т клетками (Е) в соотношении Е:Т=1:3; звездочки обозначают значимые различия в лизисе между теми лунками, где добавляли CAR Т клетки, и где не добавляли

Полученные результаты убедительно показывают, что CD45^Δ CAR45 Т клетки эффективно лизируют незлокачественные CD45-позитивные клетки крови человека.

Таким образом, *in vitro* часть экспериментов с CD45^Δ CAR45 Т клетками свидетельствует о том, что они цитотоксически активны против аутологичных CD45-позитивных гемопоэтических клеток человека, распознают широкий спектр опухолевых линий и их функциональная активность сопоставима с CAR19 Т клетками.

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

CAR NK клетки считаются перспективной альтернативой CAR Т клеткам благодаря широкому спектру механизмов запуска цитотоксичности, в том числе независимых от CAR, и низкому риску аллореактивности [149]. Еще одним преимуществом CAR NK клеток является более короткая персистенция, что делает их пригодными для кратковременной иммунотерапии, которая требуется при кондиционировании пациентов [150]. Поэтому в рамках исследовательской работы

мы нацелились на получение функциональных и устойчивых к аутоксичности CD45^Δ CAR45 NK клеток. Протокол, использованный для наработки CD45^Δ CAR45 Т клеток, был оптимизирован для NK клеток (подробная информация о манипуляциях с NK клетками приведена в главе Методы работы с эукариотическими клетками). При этом нокаут гена *PTPRC*, кодирующего CD45, в NK клетках оказался столь же эффективен (Рисунок 42).

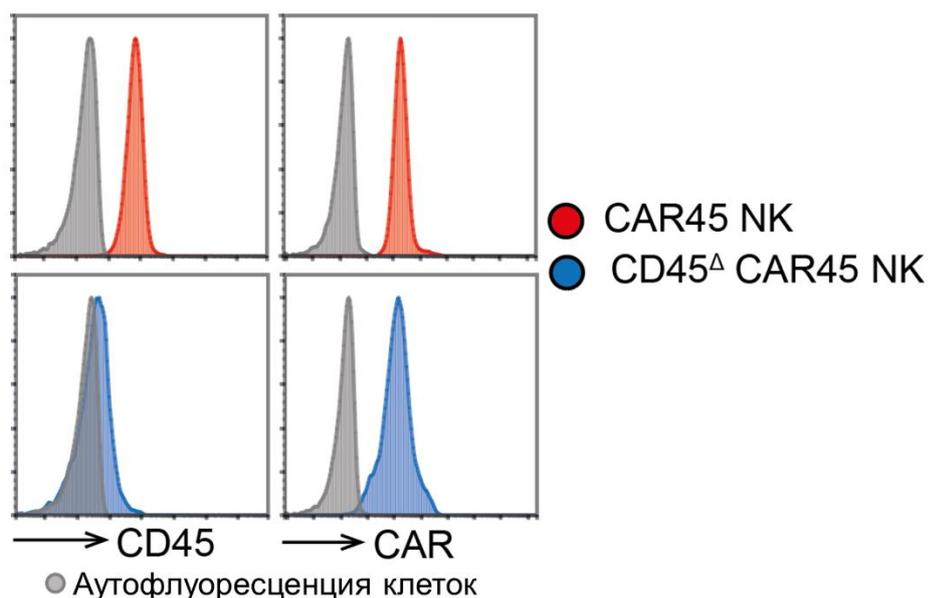


Рисунок 42 – Окраска NK клеток после трансдукции и нокаута флуоресцентно меченными МкАТ к CD45 и CAR45 и анализ экспрессии этих маркеров методом проточной цитофлуориметрии

Как и CD45^Δ CAR45 Т клетки, CD45^Δ CAR45 NK клетки активно лизируют Т клетки и РВМС (Рисунок 43).

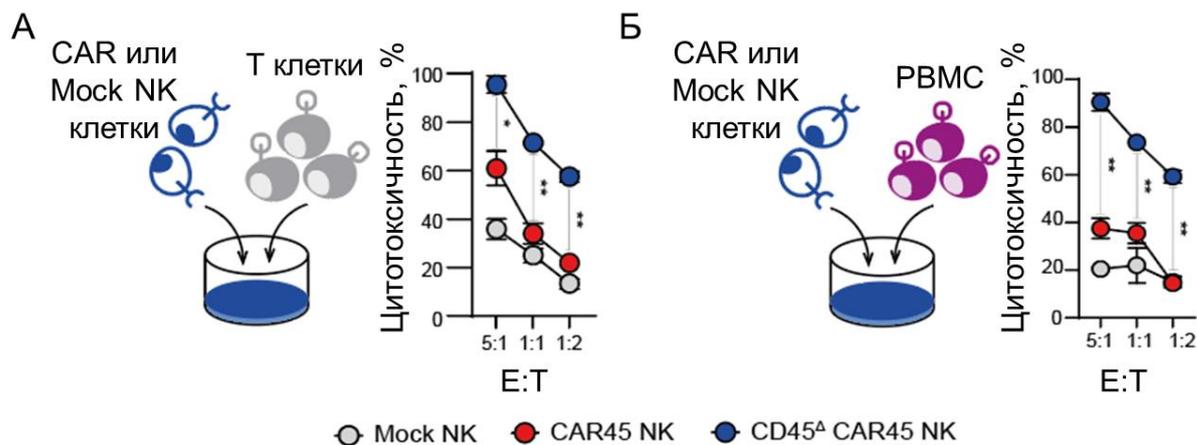


Рисунок 43 – Сравнительный анализ цитотоксичности CD45^Δ CAR45 NK клеток (E) и CAR45 NK клеток (E) в отношении гемопоэтических клеток человека, окрашенных с помощью CFSE (осуществляли методом проточной цитофлуориметрии); А – цитоллиз Т клеток; Б – цитоллиз PBMC; звездочки обозначают значимые различия в лизисе между CD45^Δ CAR45 NK клетками и CAR45 NK клетками, особенно при низком соотношении E:T=1:2.

Как видно из результатов анализа методом проточной цитофлуориметрии, CD45^Δ CAR45 NK клетки действуют ожидаемо эффективнее лизируют таргетные клетки, чем ненокаутные по CD45 CAR45 NK клетки.

Результаты элиминации CD45-позитивных опухолевых таргетных клеток, полученных на предыдущем этапе, не представлены, так как одинаковы для всех NK клеток независимо от трансдукции геном CAR и нокаута за счет обширного спектра независимых от CAR литических механизмов, который практически исключает возможность отделить активацию цитотоксичности благодаря взаимодействию CD45 и CAR45 от других путей.

Полученные результаты подтверждают возможность использования полученных CD45^Δ CAR45 NK клеток для адоптивной иммунотерапии. Полноценная оценка безусловно предполагает эксперименты на релевантных животных моделях, создание которых значительно сложнее такового для Т клеток из-за особенностей NK клеток, которые требуют в том числе непрерывной цитокиновой поддержки *in vivo* [151]. Поэтому мы решили сосредоточиться именно на CD45^Δ CAR45 Т клетках в экспериментах с животными.

4.2.8. CD45^Δ CAR45-T-клетки эффективнее CAR45 T клеток элиминируют CD45-позитивные гемопоэтические клетки человека *in vivo*

Для создания релевантной животной модели CD45-позитивной опухоли мы выбрали клеточную линию ТНР-1, которая является классическим объектом изучения особенностей развития острого миелоидного лейкоза *in vivo* [152-155]. Мышам линии *NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{em1Smoc}* (NCG) внутривенно подсаживали клетки ТНР-1 ffLuc/GFP. Через три дня мышей делили на группы и вводили внутривенно Mock T клетки, CAR45 T клетки или CD45^Δ CAR45 T клетки. Более подробно с протоколами экспериментов можно ознакомиться в главе Методы работы с животными. Развитие опухоли визуализировали еженедельно или раз в две недели методом прижизненной детекции люминесцентного сигнала (Рисунок 44А, Б), а также наблюдали за выживаемостью мышей в долговременном периоде (Рисунок 44В).

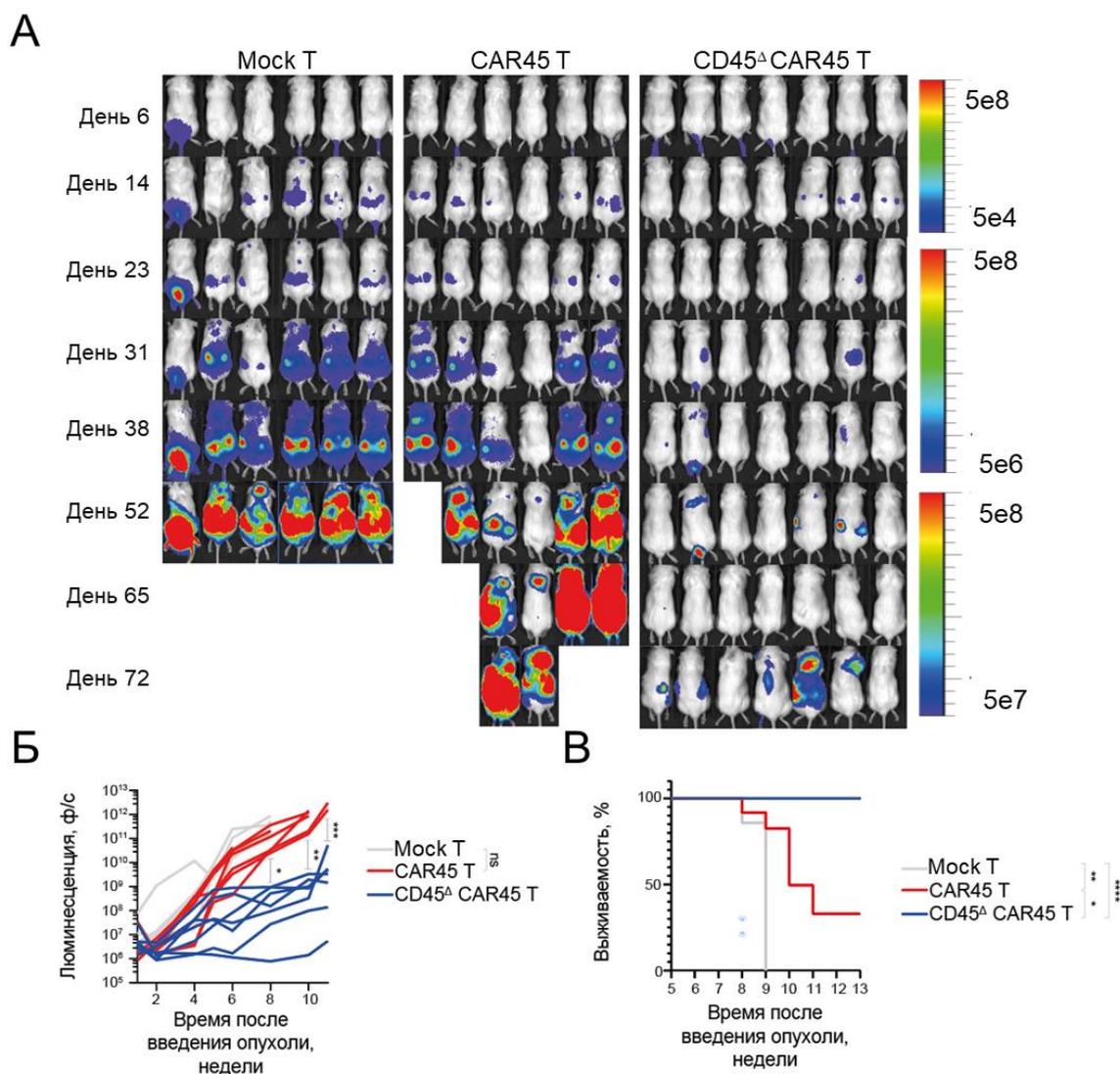


Рисунок 44 – Сравнительный анализ элиминации CD45-позитивной опухоли CD45^Δ CAR45 T клетками и CAR45 T клетками *in vivo*; А – визуализация развития опухоли; Б – динамика люминесценции в течение эксперимента; В – график выживаемости мышей по группам; звездочки показывают значимые отличия в динамике опухолевого сигнала и выживаемости мышей между группами животных с разной терапией, главным образом между получающими CD45^Δ CAR45 T клетки и CAR45 T клетки

ТНР-1 образуют локальные очаги с микроокружением, которое препятствует терапевтическому действию CAR T клеток. Но как показывают результаты, CD45^Δ CAR45 T клетки достаточно эффективно лизируют CD45-позитивную опухоль и способствуют лучшей выживаемости лабораторных животных. При этом

терапевтический эффект от применения ненокраутных по CD45 CAR45 T лимфоцитов ожидаемо хуже из-за их склонности к аутоксичности.

Для оценки потенциала к элиминации незлокачественных CD45-позитивных клеток крови человека необходима адекватная животная модель. Наиболее релевантным является создание гуманизированных мышей, которым заменяют гемопоэз на человеческий с помощью CD34-позитивных клеток. Однако такие модели довольно сложно реализуемы, долго производятся и высока вероятность неудачи при их получении. Альтернативой могут быть мыши, «гуманизированные» с помощью человеческих PBMC [156]. Воспроизводимость этой модели гораздо выше, поэтому именно ее мы взяли за основу эксперимента. Иммунодефицитным мышам линии NCG внутривенно подсаживали аутологичные для CAR T клеток человеческие PBMC. Через 4 недели определяли химеризм (долю человеческих клеток среди всех CD45-позитивных клеток в крови мышей) методом проточной цитофлуориметрии. Затем мышей делили на группы и внутривенно вводили CD45^Δ Mock T клетки (группа I), CD45^Δ CAR19 T клетки (группа II) либо CD45^Δ CAR45 T клетки (группа III) (Рисунок 45А). Более подробно с протоколами экспериментов можно ознакомиться в главе Методы работы с животными. Способность CD45^Δ CAR45 T клеток к элиминации PBMC оценивали методом проточной цитофлуориметрии, детектируя изменение химеризма (Рисунок 45Б, В).

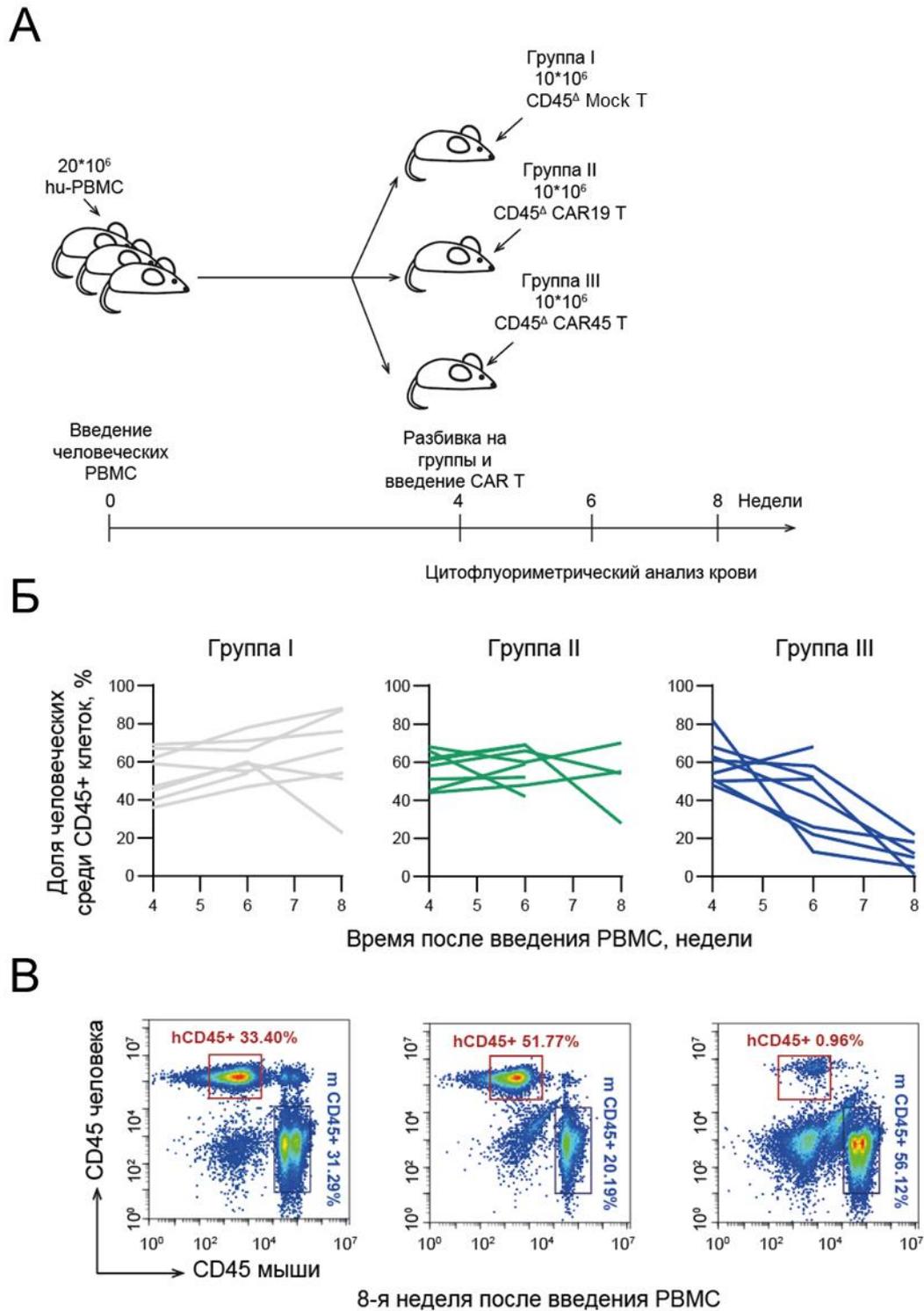


Рисунок 45 – Сравнительный анализ элиминации аутологичных PBMC CD45^A CAR45 T клетками и CD45^A CAR19 T клетками *in vivo*; А – схема эксперимента; Б – динамика химеризма (значения получены в результате анализа методом проточной цитофлуориметрии); В – окраска крови мышей флуоресцентно меченными МкАТ 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 PBMC. В целом, проведенные доклинические эксперименты подтверждают эффективную элиминацию CD45-позитивных гемопоэтических клеток человека, в том числе злокачественных, полученными CD45^Δ CAR45 T клетками.

Для трансляции в клинику необходимо использовать различные способы защиты пациента от длительной персистенции CD45^Δ CAR45 T клеток, так как донорские ГСК будут элиминироваться оставшимися после адоптивного клеточного кондиционирования. Вводить защитные меры можно либо после терапии, либо на этапе получения CD45^Δ CAR45 T клеток. 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 их индуцируемого лизиса; можно модифицировать T лимфоциты с помощью мРНК, кодирующей CAR45, которая обеспечивает временную экспрессию рецептора. Эти и другие методы модификации уже доказали свою эффективность в смежных исследованиях различных CAR T клеток [157-161].

В результате выполнения первой части исследовательской работы мы получили устойчивые к аутоксичности CD45-специфичные CD45^Δ CAR45 T клетки и CD45^Δ CAR45 NK клетки, и продемонстрировали, что они эффективно элиминируют человеческие CD45-позитивные клетки крови, включая злокачественные, на релевантных животных моделях.

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

Благоприятным исходом терапии онкологических заболеваний является достижение ремиссии у пациента. К сожалению, в ряде случаев ремиссия способна перейти в состояние релапса, лечение которого часто предполагает новые раунды химио- или радиотерапии. Это негативно влияет на все активно делящиеся клетки и, в том числе, на T лимфоциты пациента. Поэтому лечение аутологичными CAR T клетками может не сработать в таких случаях.

4.3.1. История пациентов для терапии аллогенными CAR19 Tm клетками

5 пациентов НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева с В-клеточным острым лимфобластным лейкозом перенесли целый ряд как традиционных методов лечения, так и иммунотерапевтических, включая терапию аутологичными CAR19 T клетками, терапию блинатумомабом и ТГСК (Таблица 3).

Таблица 3 – История пациентов столкнувшиеся с повторными релапсами

Пациент	Заболевание	Предыдущая иммунотерапия	Релапс В-ALL перед аллогенной терапией, % бластов 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. Для их терапии теоретически можно было использовать CAR T клетки, полученные из аллогенных T лимфоцитов, функциональное состояние которых значительно лучше, чем у T лимфоцитов пациента. Но в этом случае высоки риски возникновения реакции трансплантат против хозяина.

Предыдущий опыт ведения пациентов, прошедших ТГСК показал, что для борьбы с вирусными инфекциями после трансплантации можно использовать

инфузию Т клеток памяти от гаплоидентичных доноров. Они снижали риск вирусных заболеваний, не вызывая при этом тяжелой РТПХ [118, 119]. Кроме того, в доклинических исследованиях было показано, что CAR Т клетки, полученные из Т клеток памяти элиминируют опухоли также эффективно, как и классические CAR Т клетки, а при аллогенном введении не вызывают тяжелой РТПХ у животных [131]. Было решено впервые провести экспериментальное исследование CAR19 Тм клеток в качестве терапии “последней надежды” для этих 5-и пациентов.

4.3.2. Полученные CAR19 Тм клетки отличаются по составу поверхностных маркеров от CAR19 Т клеток

CAR19 Тм клетки получали в системе CliniMACS (Miltenyi Biotec, Германия) (Рисунок 46), которая позволяет производить CAR Т клетки из CD45RA-негативных Т лимфоцитов в рамках закрытого контура в объеме, подходящем для проведения клинических исследований.



Рисунок 46 – Состав системы для наработки CAR19 Тм клеток; CliniMACS Plus служит для обеднения или обогащения исходного клеточного материала определенными клеточными популяциями за счет магнитных шариков со стрептавидином и коктейля биотинилированных

антител к маркерам этих популяций, CliniMACS Prodigy служит для модификации исходного клеточного материала и наработки модифицированных клеток в клинических масштабах

Полученные клетки перед введением пациентам были охарактеризованы по набору маркеров методом проточной цитофлуориметрии после окрашивания соответствующими флуоресцентно мечеными МкАТ (Рисунок 47).

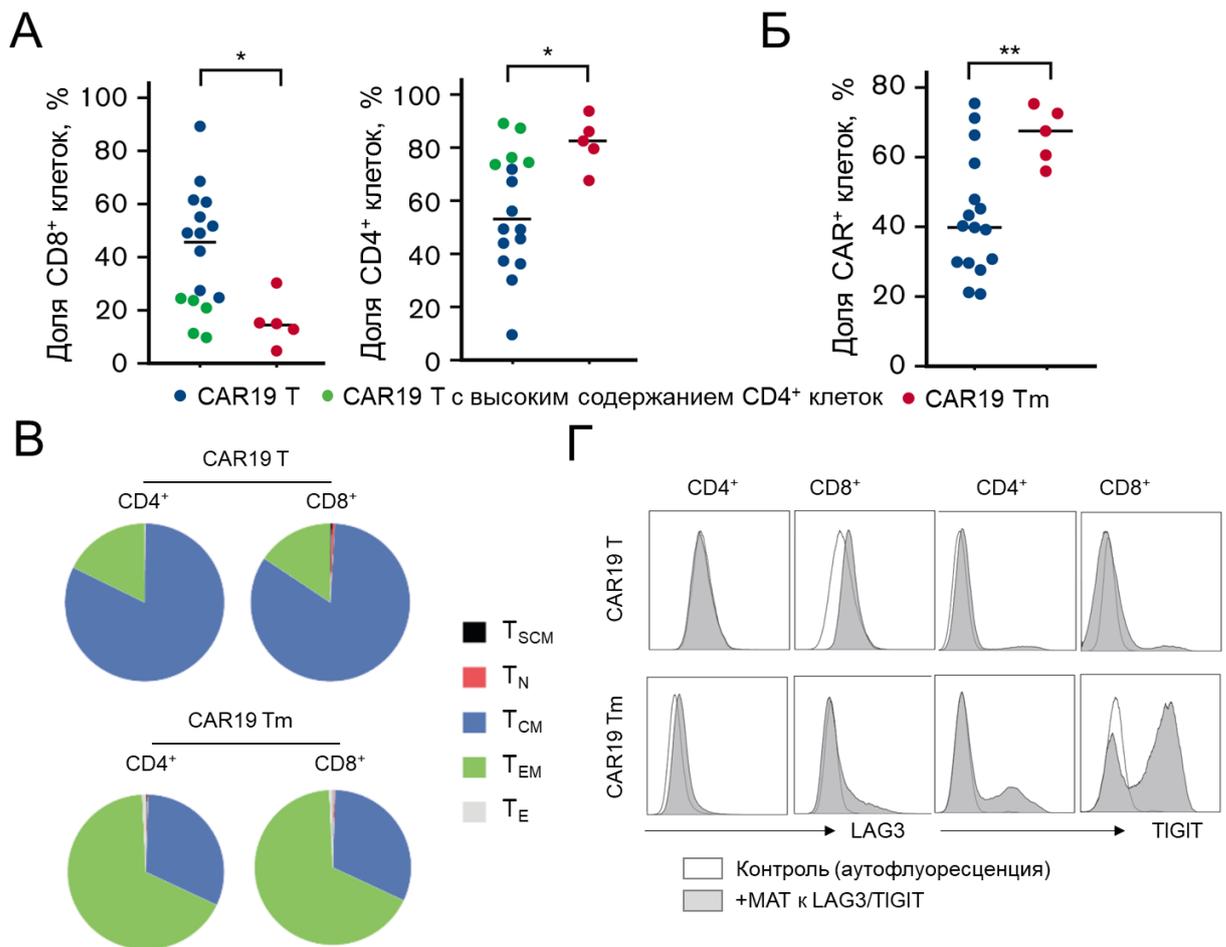


Рисунок 47 – Сравнительная характеристика CAR19 Tm клеток и CAR19 T клеток перед введением пациенту; А – Соотношение CD8⁺ и CD4⁺ популяций Т лимфоцитов; Б – Доля CAR⁺ Т клеток; В – Фенотип CD8⁺ и CD4⁺ популяций; Г – Окрашивание флуоресцентно мечеными МкАТ к маркерам истощения LAG3 и TIGIT; данные получены с помощью иммунофенотипирования; звездочки обозначают значимую разницу в экспрессии CD4, CD8 и CAR19 между CAR19 Tm клетками и CAR19 T клетками

Как видно по результатам, в CAR19 Tm клетках превалирует содержание CD4⁺ Т лимфоцитов (Рисунок 47А), хотя в ряде случаев у CAR19 Т клеток тоже преобладают CD4⁺ Т лимфоциты. Разница в проценте трансдукции (Рисунок 47Б)

вероятно обусловлена разными донорами. Большая часть CAR19 Tm клеток – это T_{EM} лимфоциты (Рисунок 47B), что означает более дифференцированную популяцию с меньшей склонностью к пролиферации относительно CAR19 T клеток, большая часть из которых – это T_{CM} лимфоциты. Кроме того, CAR19 Tm клетки склонны экспрессировать некоторые маркеры истощения (LAG3 и TIGIT) (Рисунок 47Г). Полученные данные хотя и свидетельствуют о том, что фенотипически CAR19 Tm клетки отличаются от CAR19 T клеток (при этом не в положительную сторону), ключевой характеристикой является терапевтический потенциал, который оценили в клиническом исследовании.

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

Вся клиническая часть была выполнена на базе НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Эффективность терапии пациентов CAR19 Tm клетками определял показатель минимального остаточного заболевания (MRD, Minimal residual disease).

Адоптивная CAR19 Tm клеточная иммунотерапия привела к положительному клиническому исходу в 80% случаев (Таблица 4).

Таблица 4 – 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

Среди пациентов не наблюдалось тяжелой (3 и 4 степени) РТПХ (1 пациент с 1 степенью РТПХ), CRS (2 пациента с 1 и 2 степенью) и нейротоксичности (те же 2 пациента с CRS, но оба с 1 степенью нейротоксичности).

Кроме проявления побочных реакций, на протяжении лечения отслеживали персистенцию CAR19 Tm клеток (Рисунок 48).

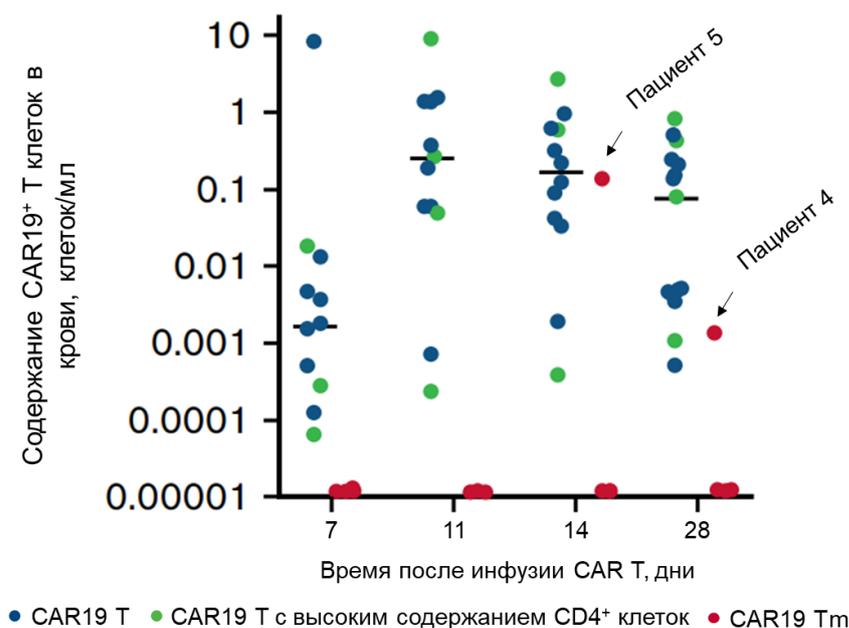


Рисунок 48 – Сравнительный анализ персистенции CAR19⁺ Т лимфоцитов в организме пациентов после терапии CAR19 Тm клетками и CAR19 Т клетками (с помощью окрашивания флуоресцентно мечеными МкАТ к CD3 и CAR19 и последующей детекцией методом проточной цитофлуориметрии); каждая точка – отдельный пациент, при этом для ряда пациентов (#1-#4) присутствует результат как терапии CAR19 Т клетками, так и CAR19 Тm клетками; стрелочками обозначены пациенты, у которых присутствовали CAR19 Тm клетки в крови в определенный момент после терапии

Как видно по результатам, только у 20% пациентов в крови детектируются CAR19 Тm клетки. Это отличается от полученных ранее данных, так же представленных на графике, после введения CAR19 Т клеток, которые в той или иной степени присутствовали в крови у всех пациентов. Отличия вероятно связаны с разным популяционным составом, определяющим в том числе поведение Т лимфоцитов *in vivo*, у CAR19 Тm клеток и CAR19 Т клеток.

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

4.3.4. CAR19 Тm клетки не уступают CAR19 Т клеткам в реакциях активации и немедленной цитотоксичности, но быстрее теряют способность лизировать таргетные клетки при повторной инкубации с ними

Мы сравнили способность CAR19 Tm клеток и CAR19 T клеток к цитоллизу CD19-позитивных опухолевых клеток, секрецию провоспалительных цитокинов и экспрессию маркеров активации. В качестве таргетных клеток использовали Jeko-1, модифицированные ранее с помощью лентивирусного агента NucLight Red Lentivirus (Sartorius, Германия), чтобы продуцировать красный флуоресцентный белок mKate2. Мы ежечасно следили за падением флуоресценции от таргетных клеток Jeko-1 благодаря их лизису в течение двух дней инкубации (Рисунок 49).

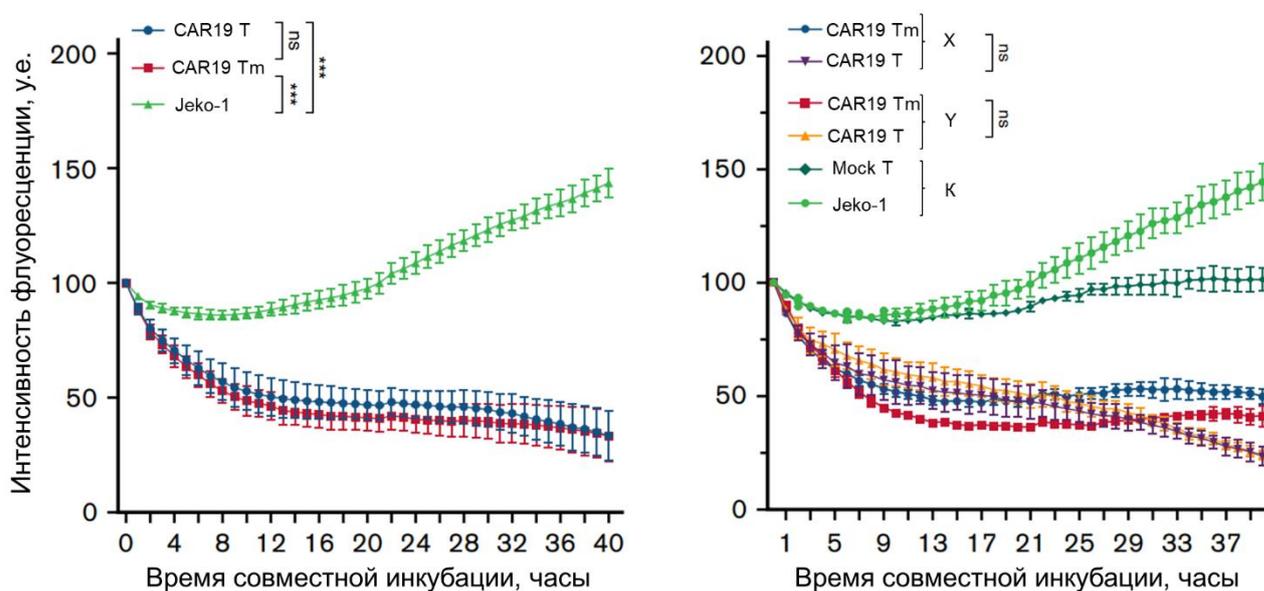


Рисунок 49 – Сравнительный анализ немедленной цитотоксичности CAR19 Tm клеток и CAR19 T клеток методом, основанным на детекции падения флуоресцентного сигнала от таргетных клеток в течение определенного промежутка времени; X, Y – разные пациенты; K – контроли; звездочки обозначают значимую разницу в лизисе Jeko-1 между контрольными Mock T клетками и эквивалентными друг другу CAR19 Tm клетками и CAR19 T клетками

Параллельно мы сравнили продукцию провоспалительных цитокинов (Рисунок 50А) и цитолитических гранул эффекторными клетками (Рисунок 50Б) в присутствии Jeko-1 методом проточной цитофлуориметрии после окрашивания соответствующих маркеров флуоресцентно мечеными МкАТ.

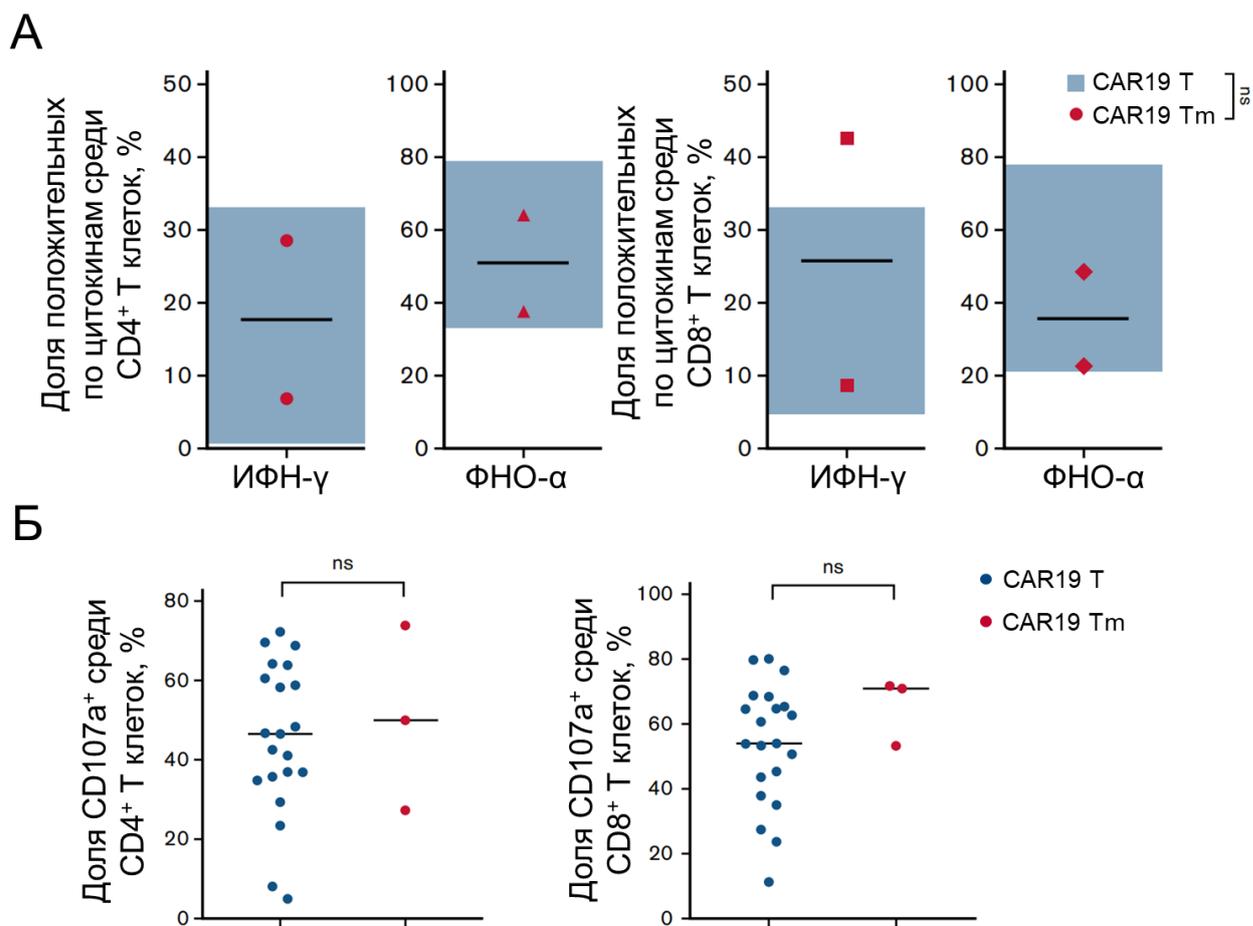


Рисунок 50 – Сравнительный анализ активации CAR19 Тm клеток и CAR19 Т клеток после окрашивания флуоресцентно меченными МкАТ к провоспалительным цитокинам и маркерам дегрануляции методом проточной цитофлуориметрии; А – продукция провоспалительных цитокинов; Б – дегрануляция; ФНО- α – фактор некроза опухоли альфа; CD107a – маркер цитолитических гранул

Полученные результаты показывают, что в краткосрочном периоде уровень активации у CAR19 Тm клеток и CAR19 Т клеток эквивалентен. Для оценки динамики уровня цитотоксичности в долгосрочном периоде мы провели стресс-тест (sequential killing), в котором к эффекторным клеткам (CAR19 Тm клеткам или CAR19 Т клеткам) каждые три дня добавляли свежие таргетные клетки (Жеко-1) в соотношении Е:Т=1:5 и оценивали цитолиз методом проточной цитофлуориметрии, детектируя снижение количества флуоресцирующих Жеко-1 (Рисунок 51).

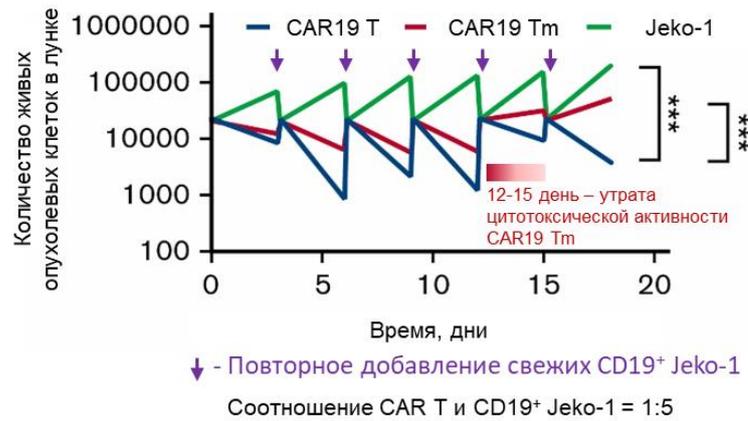


Рисунок 51 – Сравнительный анализ динамики уровня цитотоксичности CAR19 Tm клеток и CAR19 T клеток в стресс-тесте с регулярной повторной инкубацией со свежими CD19-позитивными таргетными клетками Jeko-1 методом проточной цитофлуориметрии; звездочки означают значимые отличия между CAR19 Tm клетками и CAR19 T клетками в последние раунды инкубации

Результаты показывают, что CAR19 Tm лимфоциты быстрее теряют способность к цитолизу опухолевых клеток (12-15 день). Данная особенность и не помешала CAR19 Tm клеткам эффективно элиминировать бласты у пациентов, тем не менее было решено провести сравнительный анализ экспрессии широкого спектра маркеров в CAR19 Tm клетках и CAR19 T клетках, чтобы выяснить какие еще факторы препятствуют сохранению длительного цитотоксического потенциала CAR19 Tm клеток.

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

Для сравнения экспрессии панели маркеров анализировали транскриптом CAR19 Tm и CAR19 T клеток. Подробно методика анализа изложена в главе Анализ РНК.

Полученные данные свидетельствуют о том, что разные группы генов экспрессированы в большей или меньшей степени в CAR19 Tm клетках (Рисунок 52).

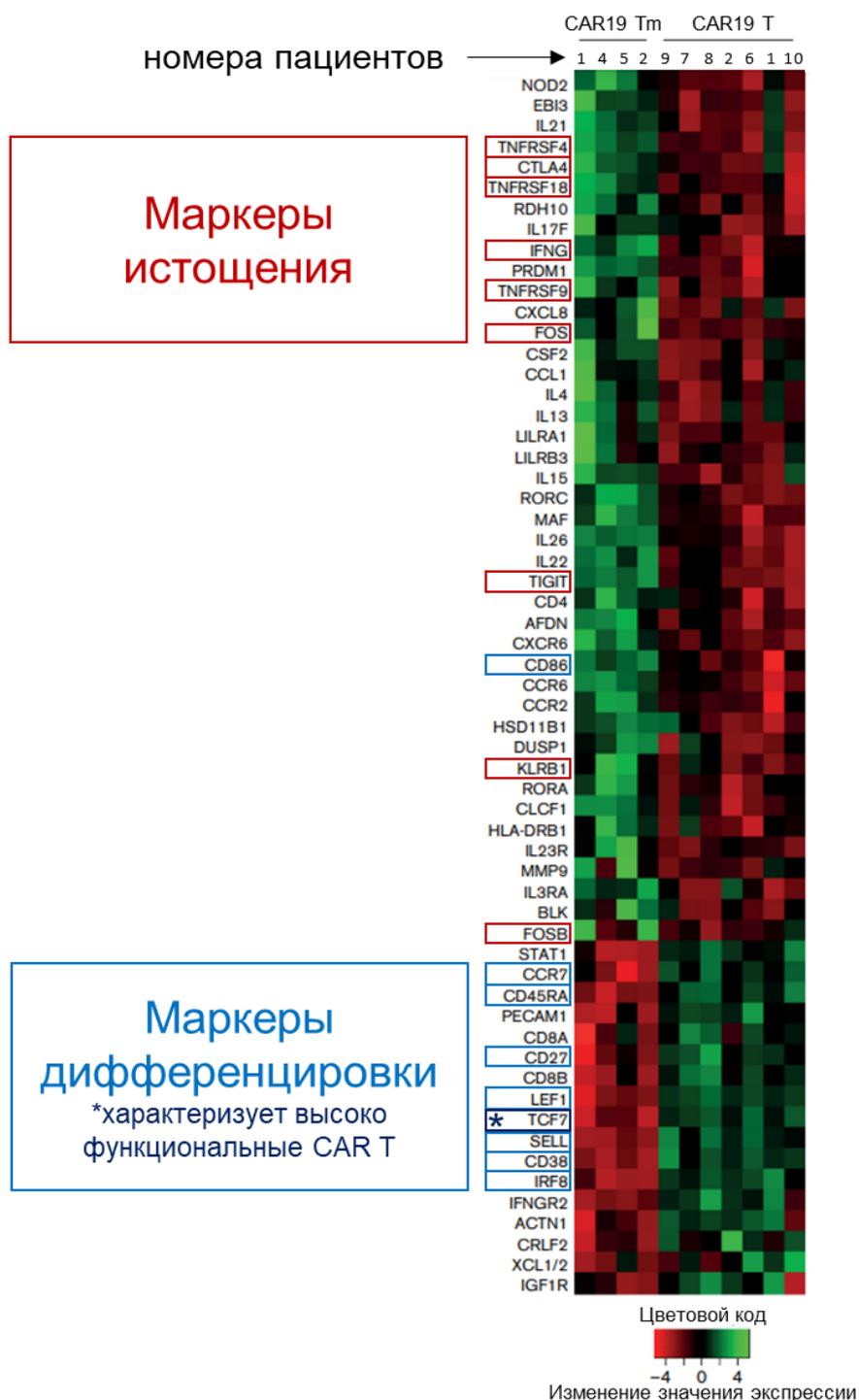


Рисунок 52 – Профили экспрессии CAR19 Tm клеток и CAR19 T клеток

Так, CAR19 Tm клетки значительно отличаются от CAR19 T клеток по профилю экспрессии маркеров дифференцировки Т лимфоцитов (LEF1, TCF7, CD86, CD38, IRF8), имеют набор маркеров более дифференцированных клеток, с минимальным количеством мРНК транскрипционного фактора TCF7. При этом недавно было показано, что TCF7 характеризует более функциональные CAR T клетки с высоким

терапевтическим потенциалом [162, 163]. В то же время CAR19 Tm клетки содержат больше мРНК интерлейкинов суперсемейства ИЛ-2 (ИЛ-4, ИЛ-15, ИЛ-21 и др.) и маркеров истощения Т лимфоцитов (CTLA-4, TIGIT, KLRB1 и др.), что расширяет полученные до этого результаты исследования маркеров истощения. В целом данные сравнительного анализа транскриптома показывают, что CAR19 Tm клетки более истощенные, более дифференцированные, чем CAR19 Т клетки, и экспрессируют меньше маркеров, ответственных за более высокий терапевтический потенциал. Мы предполагаем, что это связано с тем, что CAR19 Tm лимфоциты в принципе ограничены по количеству популяций только клетками памяти, большая часть из которых T_E лимфоциты.

Для борьбы с истощением CAR Т лимфоцитов разрабатываются многочисленные подходы – от регуляции иммунных чекпойнтов (CTLA-4, TIGIT, LAG3) до воздействия на метаболические пути и транскрипционные факторы [164-172]. Большинство из них применимо и для модификации CAR19 Tm клеток. Кроме того, предыдущие исследования, проведенные в том числе в нашей лаборатории [138, 173], показывают, что снижение уровня PD-1 в CAR19 Т клетках нарушает баланс активации/торможения и приводит к гибели клеток. Интересно было бы исследовать, как данный подход влияет на CAR19 Tm клетки.

Суммируя, в результате выполнения второй части исследовательских работ впервые было показано, что аллогенные CAR19 Tm клетки, полученные из Т клеток памяти гаплоидентичных доноров, эффективно элиминируют В-ALL у пациентов, не вызывая при этом РТПХ и других побочных эффектов высокой степени тяжести. Кроме того, мы показали, что CAR19 Tm клетки обладают эквивалентной CAR19 Т клеткам цитотоксичностью и активируются на сравнимом уровне относительно классических CAR19 Т клеток. Однако за счет более выраженной экспрессии генов маркеров истощения и дифференцировки, они действуют в течение более короткого промежутка времени и, для будущей трансляции в клинику, вероятно, потребуют либо повторных введений, либо большей дозы.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пан-лейкоцитарный антиген CD45 присутствует практически на всех гемопоэтических клетках человека. Это делает его привлекательной мишенью для щадящих режимов кондиционирования перед ТГСК у пациентов, которые по тем или иным причинам не могут переносить интенсивные режимы химио- или радиотерапии. К тому же, как показали последние исследования, для большинства онкогематологических заболеваний также характерно наличие CD45 на поверхности опухолевых клеток. Благодаря этим свойствам, CD45 можно использовать как универсальную мишень и совместить лечение опухолей и кондиционирование, так как часто эти процедуры выполняются последовательно.

В процессе работы мы получили устойчивые к аутоксичности CD45^Δ CAR45 Т клетки и CD45^Δ CAR45 NK клетки. Установили, что нокаут гена, кодирующего CD45, не влияет на цитотоксичность, но способствует снижению продукции провоспалительных цитокинов. Мы продемонстрировали специфичный лизис CD45-позитивных клеток крови человека, включая злокачественные, *in vitro*. Мы получили релевантные животные модели с ксенографтами CD45-позитивных человеческих опухолей ТНР-1 и человеческих РВМС. *In vivo* был продемонстрирован высокий терапевтический потенциал полученных CD45^Δ 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.

CAR Т клеточная терапия аутологичными клетками является клинически одобренным стандартом на сегодняшний день. Однако она предполагает использование истощенных предыдущими раундами лечения Т лимфоцитов пациента, что ухудшает качество конечного продукта и повышает риски при его производстве. Аллогенная терапия CAR Т клетками, полученными из Т лимфоцитов здоровых доноров, в перспективе способна стать альтернативой и

предлагает более эффективное лечение и снижение затрат и рисков при производстве. Однако, аллогенная природа CAR T клеток сопряжена с высокой вероятностью возникновения РТПХ. Недавние доклинические исследования убедительно показали – Т клетки памяти менее склонны к развитию РТПХ. При этом CAR Т клетки, полученные из них, аналогичны классическим в эффективности элиминации опухолей и не вызывают РТПХ. Популяцию Т клеток памяти определяет отсутствие у них на поверхности изоформы CD45 – CD45RA.

В рамках данной диссертации мы охарактеризовали аллогенные CAR19 Тm клетки, полученные из CD45RA-негативных Т лимфоцитов гаплоидентичных здоровых доноров. Мы обнаружили, что среди CAR19 Тm клеток преобладают CD4-позитивные Т лимфоциты эффекторной памяти. На базе НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева впервые были получены клинические данные применения CAR19 Тm клеточной терапии для 5-ти пациентов. Была продемонстрирована эффективная элиминация клеток В клеточного острого миелоидного лейкоза CAR19 Тm клетками (в 80% случаев), при этом не проявились побочные эффекты, включая РТПХ, высокой степени тяжести. В рамках сравнительного *in vitro* и *ex vivo* исследования и транскриптомного анализа CAR19 Тm клеток и CAR19 Т клеток мы показали их эквивалентность в реакциях немедленной цитотоксичности и активации. В то же время мы обнаружили различия CAR19 Тm клеток в динамике уровня цитотоксичности в стресс-тесте (в сторону ее уменьшения) и в экспрессии нескольких групп генов, ответственных в том числе за наиболее функциональный фенотип Т лимфоцитов (в сторону уменьшения экспрессии маркеров, ассоциированных с более функциональным фенотипом). Открытые особенности CAR19 Тm клеток, не помешали им продемонстрировать эффективную элиминацию опухоли в отсутствие РТПХ. Необходимо и далее исследовать CAR19 Тm клетки, модифицируя их профиль экспрессии, и адаптируя режимы введения, для более успешной интеграции аллогенных CAR Т клеток в клиническую практику.

Суммируя, следует сказать, что данная работа является важной частью современных исследований, направленных на совершенствование терапии

онкогематологических заболеваний в России и в мире, и помогает обозначить в том числе направления будущих исследований в сфере иммунотерапевтических подходов в онкологии.

6. ВЫВОДЫ

1. Методами генной и клеточной инженерии получены устойчивые к аутоксичности CD45^Δ CAR45 Т клетки и CD45^Δ CAR45 NK клетки;
2. Показана функциональная активность CD45^Δ CAR45 Т клеток и CD45^Δ CAR45 NK клеток в отношении человеческих CD45-позитивных клеток крови *in vitro*;
3. Показана способность CD45^Δ 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.

СОКРАЩЕНИЯ

Русскоязычные:

АПК – антигенпрезентирующие клетки

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

ИЛ – интерлейкин

ИФН- γ – гамма-интерферон

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

МкАТ – моноклональные антитела

РТПХ – реакция трансплантат против хозяина

ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

ТКР – Т клеточный рецептор

Англоязычные:

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

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

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

CAR19 T_m – 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)

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)

NCG – линия иммунодефицитных мышей *NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{em1Smc}*

NK – натуральные киллеры (natural killer)

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

T_E – эффекторные, или 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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tuthill M., Hatzimichael E. Hematopoietic stem cell transplantation // *Stem Cells Cloning*. 2010. V. 2010. № 3. P. 105.
2. Rafiee M., Abbasi M., Rafieemehr H., Mirzaeian A., et al. A concise review on factors influencing the hematopoietic stem cell transplantation main outcomes // *Health Sci. Rep.* 2021. V. 4. № 2. P. e282.
3. Pinho S., Frenette P. S. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019. V. 20. № 5. P. 303-320.
4. Wei Q., Frenette P. S. Niches for hematopoietic stem cells and their progeny // *Immunity*. 2018. V. 48. № 4. P. 632-648.
5. Ugarte F., Forsberg E. C. Haematopoietic stem cell niches: new insights inspire new questions // *EMBO J.* 2013. V. 32. № 19. P. 2535-2547.
6. Héroult A., Binnewies M., Leong S., Calero-Nieto F. J., et al. Myeloid progenitor cluster formation drives emergency and leukaemic myelopoiesis // *Nature*. 2017. V. 544. № 7648. P. 53-58.
7. Niederkorn M., Starczynowski D. T. GMP-ing to spatial conclusions about emergency and leukemic myelopoiesis // *Cell Stem Cell*. 2017. V. 20. № 5. P. 579-581.
8. Griffin J. M., Healy F. M., Dahal L. N., Floisand Y., et al. Worked to the bone: antibody-based conditioning as the future of transplant biology // *J. Hematol. Oncol.* 2022. V. 15. № 1. P. 65.
9. Vriesendorp H. M. Aims of conditioning // *Exp. Hematol.* 2003. V. 31. № 10. P. 844-854.
10. Bouchlaka M. N., Redelman D., Murphy W. J. Immunotherapy following hematopoietic stem cell transplantation: potential for synergistic effects // *Immunotherapy*. 2010. V. 2. № 3. P. 399-418.
11. Chang Y.-J., Zhao X.-Y., Huang X.-J. Strategies for enhancing and preserving anti-leukemia effects without aggravating graft-versus-host disease // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. № P. 3041.

12. Gyurkocza B., Sandmaier B. M. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all // *Blood*. 2014. V. 124. № 3. P. 344-353.
13. Deeg H. J., Sandmaier B. M. Who is fit for allogeneic transplantation? // *Blood*. 2010. V. 116. № 23. P. 4762-4770.
14. Ebens C. L., MacMillan M. L., Wagner J. E. Hematopoietic cell transplantation in Fanconi anemia: current evidence, challenges and recommendations // *Expert Rev. Hematol.* 2017. V. 10. № 1. P. 81-97.
15. Giardino S., de Latour R. P., Aljurf M., Eikema D.-J., et al. 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. V. 95. № 7. P. 809-816.
16. Riolland F., Grain A., Labopin M., Michel G., et al. Reduced-toxicity myeloablative conditioning regimen using fludarabine and full doses of intravenous busulfan in pediatric patients not eligible for standard myeloablative conditioning regimens: Results of a multicenter prospective phase 2 trial // *Bone Marrow Transplant.* 2022. V. 57. № 11. P. 1698-1703.
17. Brammer J. E., Stentz A., Gajewski J., Curtin P., et al. Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplant for the treatment of patients with hematologic malignancies using busulfan, fludarabine, and total body irradiation conditioning is effective in an elderly and infirm population // *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2015. V. 21. № 1. P. 89-96.
18. Atilla E., Ataca Atilla P., Demirer T. A review of myeloablative vs reduced intensity/non-myeloablative regimens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantations // *Balkan Med. J.* 2017. V. 34. № 1. P. 1-9.
19. Slatter M. A., Rao K., Abd Hamid I. J., Nademi Z., et al. Treosulfan and fludarabine conditioning for hematopoietic stem cell transplantation in children with primary immunodeficiency: UK experience // *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2018. V. 24. № 3. P. 529-536.
20. Law J., Cowan M. J., Dvorak C. C., Musick L., et al. Busulfan, fludarabine, and alemtuzumab as a reduced toxicity regimen for children with malignant and nonmalignant

- diseases improves engraftment and graft-versus-host disease without delaying immune reconstitution // *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2012. V. 18. № 11. P. 1656-1663.
21. Jagadeesh D., Majhail N. S., He Y., Ahn K. W., et al. Outcomes of rituximab-BEAM versus BEAM conditioning regimen in patients with diffuse large B cell lymphoma undergoing autologous transplantation // *Cancer.* 2020. V. 126. № 10. P. 2279-2287.
22. Epperla N., Ahn K. W., Ahmed S., Jagasia M., et al. Rituximab-containing reduced-intensity conditioning improves progression-free survival following allogeneic transplantation in B cell non-Hodgkin lymphoma // *J. Hematol. Oncol.* 2017. V. 10. № 1. P.
23. Chen Y.-B., Shah N. N., Renteria A. S., Cutler C., et al. Vedolizumab for prevention of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation // *Blood Adv.* 2019. V. 3. № 23. P. 4136-4146.
24. Marjon K. D., Chen J. Y., Duan J., Choi T. S., et al. An all antibody approach for conditioning bone marrow for Hematopoietic stem cell transplantation with anti-cKIT and anti-CD47 in non-human primates // *Blood.* 2019. V. 134. № Supplement_1. P. 4428-4428.
25. Kwon H.-S., Logan A. C., Chhabra A., Pang W. W., et al. Anti-human CD117 antibody-mediated bone marrow niche clearance in nonhuman primates and humanized NSG mice // *Blood.* 2019. V. 133. № 19. P. 2104-2108.
26. Chhabra A., Ring A. M., Weiskopf K., Schnorr P. J., et al. Hematopoietic stem cell transplantation in immunocompetent hosts without radiation or chemotherapy // *Sci. Transl. Med.* 2016. V. 8. № 351. P. 351ra105-351ra105.
27. George B. M., Kao K. S., Kwon H.-S., Velasco B. J., et al. Antibody conditioning enables MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplants and organ graft tolerance // *Cell Stem Cell.* 2019. V. 25. № 2. P. 185-192.e3.
28. Palchaudhuri R., Saez B., Hoggatt J., Schajnovitz A., et al. Non-genotoxic conditioning for hematopoietic stem cell transplantation using a hematopoietic-cell-specific internalizing immunotoxin // *Nat. Biotechnol.* 2016. V. 34. № 7. P. 738-745.
29. Li Z., Czechowicz A., Scheck A., Rossi D. J., et al. Hematopoietic chimerism and donor-specific skin allograft tolerance after non-genotoxic CD117 antibody-drug-

- conjugate conditioning in MHC-mismatched allotransplantation // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 616.
30. Wadleigh M., Richardson P. G., Zahrieh D., Lee S. J., et al. Prior gemtuzumab ozogamicin exposure significantly increases the risk of veno-occlusive disease in patients who undergo myeloablative allogeneic stem cell transplantation // *Blood.* 2003. V. 102. № 5. P. 1578-1582.
31. Abadir E., Silveira P. A., Gasiorowski R. E., Ramesh M., et al. Targeting CD300f to enhance hematopoietic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia // *Blood Adv.* 2020. V. 4. № 7. P. 1206-1216.
32. Krishnan A., Palmer J. M., Tsai N.-C., Simpson J. R., et al. Matched-cohort analysis of autologous hematopoietic cell transplantation with radioimmunotherapy versus total body irradiation-based conditioning for poor-risk diffuse large cell lymphoma // *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2012. V. 18. № 3. P. 441-450.
33. Arai Y., Choi U., Corsino C. I., Koontz S. M., et al. Myeloid conditioning with c-kit-targeted CAR-T cells enables donor stem cell engraftment // *Mol. Ther.* 2018. V. 26. № 5. P. 1181-1197.
34. Myburgh R., Kiefer J. D., Russkamp N. F., Magnani C. F., et al. Anti-human CD117 CAR T-cells efficiently eliminate healthy and malignant CD117-expressing hematopoietic cells // *Leukemia.* 2020. V. 34. № 10. P. 2688-2703.
35. Tambaro F. P., Singh H., Jones E., Rytting M., et al. Autologous CD33-CAR-T cells for treatment of relapsed/refractory acute myelogenous leukemia // *Leukemia.* 2021. V. 35. № 11. P. 3282-3286.
36. Sugita M., Galetto R., Zong H., Ewing-Crystal N., et al. Allogeneic TCR $\alpha\beta$ deficient CAR T-cells targeting CD123 in acute myeloid leukemia // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 2227.
37. El Khawanky N., Hughes A., Yu W., Myburgh R., et al. Demethylating therapy increases anti-CD123 CAR T cell cytotoxicity against acute myeloid leukemia // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 6436.
38. 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. V. 45. № 2. P. 229-236.

39. Hermiston M. L., Xu Z., Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells // *Annu. Rev. Immunol.* 2003. V. 21. № 1. P. 107-137.
40. Volkov D. V., Stepanova V. M., Rubtsov Y. P., Stepanov A. V., et al. 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.
41. Lynch K. W., Weiss A. A CD45 polymorphism associated with multiple sclerosis disrupts an exonic splicing silencer // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 26. P. 24341-24347.
42. 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. V. 280. № 46. P. 38297-38304.
43. Earl L. A., Baum L. G. CD45 Glycosylation controls T-cell life and death // *Immunol. Cell Biol.* 2008. V. 86. № 7. P. 608-615.
44. 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. V. 201. № 3. P. 441-452.
45. 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. V. 273. № 50. P. 33856-33863.
46. Chang V. T., Fernandes R. A., Ganzinger K. A., Lee S. F., et al. Initiation of T cell signaling by CD45 segregation at 'close contacts' // *Nat. Immunol.* 2016. V. 17. № 5. P. 574-582.
47. Caldwell C. W., Patterson W. P. Relationship between CD45 antigen expression and putative stages of differentiation in B-cell malignancies // *Am. J. Hematol.* 1991. V. 36. № 2. P. 111-115.
48. Ratei R., Sperling C., Karawajew L., Schott G., et al. Immunophenotype and clinical characteristics of CD45-negative and CD45-positive childhood acute lymphoblastic leukemia // *Ann. Hematol.* 1998. V. 77. № 3. P. 107-114.
49. Nakamura A., Tsurusawa M., Kato A., Taga T., et al. Prognostic impact of CD45 antigen expression in high-risk, childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia // *Leuk. Lymphoma.* 2001. V. 42. № 3. P. 393-398.

50. Heo S.-K., Noh E.-K., Ju L. J., Sung J. Y., et al. CD45dimCD34+CD38-CD133+ cells have the potential as leukemic stem cells in acute myeloid leukemia // *BMC Cancer*. 2020. V. 20. № 1. P. 285.
51. Hoyer K. K., Pang M., Gui D., Shintaku I. P., et al. An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas // *Am. J. Pathol.* 2004. V. 164. № 3. P. 893-902.
52. Nangia-Makker P., Nakahara S., Hogan V., Raz A. Galectin-3 in apoptosis, a novel therapeutic target // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2007. V. 39. № 1. P. 79-84.
53. Clark M. C., Pang M., Hsu D. K., Liu F.-T., et al. Galectin-3 binds to CD45 on diffuse large B-cell lymphoma cells to regulate susceptibility to cell death // *Blood*. 2012. V. 120. № 23. P. 4635-4644.
54. Ishikawa H., Mahmoud M. S., Fujii R., Abroun S., et al. Proliferation of immature myeloma cells by interleukin-6 is associated with CD45 expression in human multiple myeloma // *Leuk. Lymphoma*. 2000. V. 39. № 1-2. P. 51-55.
55. Lin H., Kolosenko I., Björklund A.-C., Protsyuk D., et al. An activated JAK/STAT3 pathway and CD45 expression are associated with sensitivity to Hsp90 inhibitors in multiple myeloma // *Exp. Cell Res.* 2013. V. 319. № 5. P. 600-611.
56. Liu S., Ishikawa H., Tsuyama N., Li F. J., et al. Increased susceptibility to apoptosis in CD45(+) myeloma cells accompanied by the increased expression of VDAC1 // *Oncogene*. 2006. V. 25. № 3. P. 419-429.
57. Ishikawa H., Tsuyama N., Kawano M. M. Interleukin-6-induced proliferation of human myeloma cells associated with CD45 molecules // *Int. J. Hematol.* 2003. V. 78. № 2. P. 95-105.
58. Gonsalves W. I., Timm M. M., Rajkumar S. V., Morice W. G., et al. The prognostic significance of CD45 expression by clonal bone marrow plasma cells in patients with newly diagnosed multiple myeloma // *Leuk. Res.* 2016. V. 44. № P. 32-39.
59. Cario G., Rhein P., Mitlöhner R., Zimmermann M., et al. High CD45 surface expression determines relapse risk in children with precursor B-cell and T-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol // *Haematologica*. 2014. V. 99. № 1. P. 103-110.

60. Rizzo D., Lotay A., Gachard N., Marfak I., et al. Very low levels of surface CD45 reflect CLL cell fragility, are inversely correlated with trisomy 12 and are associated with increased treatment-free survival // *Am. J. Hematol.* 2013. V. 88. № 9. P. 747-753.
61. 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. V. 12. № 1. P. 85-116.
62. Parsons S. J., Parsons J. T. Src family kinases, key regulators of signal transduction // *Oncogene.* 2004. V. 23. № 48. P. 7906-7909.
63. 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. V. 16. № 9. P. 4996-5003.
64. Mustelin T., Taskén K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases // *Biochem. J.* 2003. V. 371. № Pt 1. P. 15-27.
65. 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. V. 8. № P. 608747.
66. 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 immunomodulators for severe cases // *Med. Hypotheses.* 2011. V. 76. № 1. P. 64-69.
67. Furlan G., Minowa T., Hanagata N., Kataoka-Hamai C., et al. Phosphatase CD45 both positively and negatively regulates T cell receptor phosphorylation in reconstituted membrane protein clusters // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. № 41. P. 28514-28525.
68. Zikherman J., Jenne C., Watson S., Doan K., et al. CD45-Csk phosphatase-kinase titration uncouples basal and inducible T cell receptor signaling during thymic development // *Immunity.* 2010. V. 32. № 3. P. 342-354.
69. Kishihara K., Penninger J., Wallace V. A., Kündig T. M., et al. Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice // *Cell.* 1993. V. 74. № 1. P. 143-156.
70. Pingel S., Baker M., Turner M., Holmes N., et al. The CD45 tyrosine phosphatase regulates CD3-induced signal transduction and T cell development in recombinase-

- deficient mice: restoration of pre-TCR function by active p56lck // *Eur. J. Immunol.* 1999. V. 29. № 8. P. 2376-2384.
71. Mee P. J., Turner M., Basson M. A., Costello P. S., et al. Greatly reduced efficiency of both positive and negative selection of thymocytes in CD45 tyrosine phosphatase-deficient mice // *Eur. J. Immunol.* 1999. V. 29. № 9. P. 2923-2933.
72. Byth K. F., Conroy L. A., Howlett S., Smith A. J., et al. CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4⁺CD8⁺ thymocytes, and B cell maturation // *J. Exp. Med.* 1996. V. 183. № 4. P. 1707-1718.
73. Molina T. J., Kishihara K., Siderovski D. P., van Ewijk W., et al. Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck // *Nature.* 1992. V. 357. № 6374. P. 161-164.
74. Lanier L. L. Natural killer cell receptor signaling // *Curr. Opin. Immunol.* 2003. V. 15. № 3. P. 308-314.
75. Samelson L. E. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins // *Annu. Rev. Immunol.* 2002. V. 20. № 1. P. 371-394.
76. Hesslein D. G. T., Takaki R., Hermiston M. L., Weiss A., et al. Dysregulation of signaling pathways in CD45-deficient NK cells leads to differentially regulated cytotoxicity and cytokine production // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. V. 103. № 18. P. 7012-7017.
77. Valitutti S., Dessing M., Aktories K., Gallati H., et al. Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton // *J. Exp. Med.* 1995. V. 181. № 2. P. 577-584.
78. Valitutti S., Müller S., Dessing M., Lanzavecchia A. Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy // *J. Exp. Med.* 1996. V. 183. № 4. P. 1917-1921.
79. Salter A. I., Rajan A., Kennedy J. J., Ivey R. G., et al. Comparative analysis of TCR and CAR signaling informs CAR designs with superior antigen sensitivity and in vivo function // *Sci. Signal.* 2021. V. 14. № 697. P. eabe2606.

80. Karlsson H., Svensson E., Gigg C., Jarvius M., et al. Evaluation of intracellular signaling downstream chimeric antigen receptors // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 12. P. e0144787.
81. Xiao Q., Zhang X., Tu L., Cao J., et al. Size-dependent activation of CAR-T cells // *Sci. Immunol.* 2022. V. 7. № 74. P. eabl3995.
82. Zheng P., Bertolet G., Chen Y., Huang S., et al. Super-resolution imaging of the natural killer cell immunological synapse on a glass-supported planar lipid bilayer // *J. Vis. Exp.* 2015. V. № 96. P.
83. Fooksman D. R., Vardhana S., Vasiliver-Shamis G., Liese J., et al. Functional anatomy of T cell activation and synapse formation // *Annu. Rev. Immunol.* 2010. V. 28. № 1. P. 79-105.
84. Harwood N. E., Batista F. D. Early events in B cell activation // *Annu. Rev. Immunol.* 2010. V. 28. № 1. P. 185-210.
85. Gomes-Silva D., Srinivasan M., Sharma S., Lee C. M., et al. CD7-edited T cells expressing a CD7-specific CAR for the therapy of T-cell malignancies // *Blood*. 2017. V. 130. № 3. P. 285-296.
86. Dai Z., Mu W., Zhao Y., Jia X., et al. The rational development of CD5-targeting biepitopic CARs with fully human heavy-chain-only antigen recognition domains // *Mol. Ther.* 2021. V. 29. № 9. P. 2707-2722.
87. Dai Z., Mu W., Zhao Y., Cheng J., et al. 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. V. 7. № 1. P. 85.
88. Sánchez-Martínez D., Baroni M. L., Gutierrez-Agüera F., Roca-Ho H., et al. Fratricide-resistant CD1a-specific CAR T cells for the treatment of cortical T-cell acute lymphoblastic leukemia // *Blood*. 2019. V. 133. № 21. P. 2291-2304.
89. Xiang J., Devenport J. M., Carter A. J., Staser K. W., et al. An "off-the-shelf" CD2 universal CAR-T therapy for T-cell malignancies // *Leukemia*. 2023. V. 37. № 12. P. 2448-2456.

90. Rasaiyaah J., Georgiadis C., Preece R., Mock U., et al. TCR $\alpha\beta$ /CD3 disruption enables CD3-specific antileukemic T cell immunotherapy // *JCI Insight*. 2018. V. 3. № 13. P.
91. Liu X., Zhang Y., Cheng C., Cheng A. W., et al. CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells // *Cell Res*. 2017. V. 27. № 1. P. 154-157.
92. Wachsmann T. L. A., Wouters A. K., Remst D. F. G., Hagedoorn R. S., et al. Comparing CAR and TCR engineered T cell performance as a function of tumor cell exposure // *Oncoimmunology*. 2022. V. 11. № 1. P. 2033528.
93. Wang X., Yang X., Yuan X., Wang W., et al. Chimeric antigen receptor-engineered NK cells: new weapons of cancer immunotherapy with great potential // *Exp. Hematol. Oncol*. 2022. V. 11. № 1. P. 85.
94. Garber K. Driving T-cell immunotherapy to solid tumors // *Nat. Biotechnol*. 2018. V. 36. № 3. P. 215-219.
95. Mao R., Kong W., He Y. The affinity of antigen-binding domain on the antitumor efficacy of CAR T cells: Moderate is better // *Front. Immunol*. 2022. V. 13. № P. 1032403.
96. Liu J., Zhong J. F., Zhang X., Zhang C. Allogeneic CD19-CAR-T cell infusion after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in B cell malignancies // *J. Hematol. Oncol*. 2017. V. 10. № 1. P.
97. Ramos C. A., Dotti G. Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy // *Expert Opin. Biol. Ther*. 2011. V. 11. № 7. P. 855-873.
98. Tokarew N., Ogonek J., Endres S., von Bergwelt-Baildon M., et al. Teaching an old dog new tricks: next-generation CAR T cells // *Br. J. Cancer*. 2019. V. 120. № 1. P. 26-37.
99. Zhang C., Liu J., Zhong J. F., Zhang X. Engineering CAR-T cells // *Biomark. Res*. 2017. V. 5. № 1. P. 22.
100. Smith A. J., Oertle J., Warren D., Prato D. Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy for malignant cancers: Summary and perspective // *J. Cell. Immunother*. 2016. V. 2. № 2. P. 59-68.
101. Acuto O., Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling // *Nat. Rev. Immunol*. 2003. V. 3. № 12. P. 939-951.

102. Hombach A., Wieczarkowicz A., Marquardt T., Heuser C., et al. Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule // *J. Immunol.* 2001. V. 167. № 11. P. 6123-6131.
103. Finney H. M., Lawson A. D. G., Bebbington C. R., Weir A. N. C. Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product // *J. Immunol.* 1998. V. 161. № 6. P. 2791-2797.
104. Chmielewski M., Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2015. V. 15. № 8. P. 1145-1154.
105. Kagoya Y., Tanaka S., Guo T., Anczurowski M., et al. A novel chimeric antigen receptor containing a JAK–STAT signaling domain mediates superior antitumor effects // *Nat. Med.* 2018. V. 24. № 3. P. 352-359.
106. Kalinin R., Shemyakin M. M., Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry R. A. o. S. M.-M. S. M. R., Petukhov A., et al. Molecular approaches to safe and controlled engineered T-cell therapy // *Acta Naturae.* 2018. V. 10. № 2. P. 16-23.
107. Kalos M., Levine B. L., Porter D. L., Katz S., et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia // *Sci. Transl. Med.* 2011. V. 3. № 95. P. 95ra73.
108. Davila M. L., Riviere I., Wang X., Bartido S., et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia // *Sci. Transl. Med.* 2014. V. 6. № 224. P. 224ra25.
109. Brentjens R. J., Rivière I., Park J. H., Davila M. L., et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias // *Blood.* 2011. V. 118. № 18. P. 4817-4828.
110. Xu X.-J., Zhao H.-Z., Tang Y.-M. Efficacy and safety of adoptive immunotherapy using anti-CD19 chimeric antigen receptor transduced T-cells: a systematic review of phase I clinical trials // *Leuk. Lymphoma.* 2013. V. 54. № 2. P. 255-260.

111. Santomaso B. D., Nastoupil L. J., Adkins S., Lacchetti C., et al. Management of immune-related adverse events in patients treated with chimeric antigen receptor T-cell therapy: ASCO guideline // *J. Clin. Oncol.* 2021. V. 39. № 35. P. 3978-3992.
112. Ceppi F., Rivers J., Annesley C., Pinto N., et al. Lymphocyte apheresis for chimeric antigen receptor T-cell manufacturing in children and young adults with leukemia and neuroblastoma // *Transfusion.* 2018. V. 58. № 6. P. 1414-1420.
113. Maude S. L., Laetsch T. W., Buechner J., Rives S., et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia // *N. Engl. J. Med.* 2018. V. 378. № 5. P. 439-448.
114. Köhl U., Arsenieva S., Holzinger A., Abken H. CAR T cells in trials: Recent achievements and challenges that remain in the production of modified T cells for clinical applications // *Hum. Gene Ther.* 2018. V. 29. № 5. P. 559-568.
115. Zhao J., Lin Q., Song Y., Liu D. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells // *J. Hematol. Oncol.* 2018. V. 11. № 1. P. 132.
116. Yang Y., Jacoby E., Fry T. J. Challenges and opportunities of allogeneic donor-derived CAR T cells // *Curr. Opin. Hematol.* 2015. V. 22. № 6. P. 509-515.
117. Liu P., Liu M., Lyu C., Lu W., et al. Acute graft-versus-host disease after humanized anti-CD19-CAR T therapy in relapsed B-ALL patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplant // *Front. Oncol.* 2020. V. 10. № P. 573822.
118. Bleakley M., Heimfeld S., Loeb K. R., Jones L. A., et al. Outcomes of acute leukemia patients transplanted with naive T cell-depleted stem cell grafts // *J. Clin. Invest.* 2015. V. 125. № 7. P. 2677-2689.
119. Dunaikina M., Zhekhovtsova Z., Shelikhova L., Glushkova S., et al. Safety and efficacy of the low-dose memory (CD45RA-depleted) donor lymphocyte infusion in recipients of $\alpha\beta$ T cell-depleted haploidentical grafts: results of a prospective randomized trial in high-risk childhood leukemia // *Bone Marrow Transplant.* 2021. V. 56. № 7. P. 1614-1624.
120. Gattinoni L., Speiser D. E., Lichterfeld M., Bonini C. T memory stem cells in health and disease // *Nat. Med.* 2017. V. 23. № 1. P. 18-27.

121. Arstila T. P., Casrouge A., Baron V. r., Even J., et al. A direct estimate of the human $\alpha\beta$ T cell receptor diversity // *Science*. 1999. V. 286. № 5441. P. 958-961.
122. Robins H. S., Campregher P. V., Srivastava S. K., Wacher A., et al. Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells // *Blood*. 2009. V. 114. № 19. P. 4099-4107.
123. Anderson B. E., McNiff J., Yan J., Doyle H., et al. Memory CD4⁺ T cells do not induce graft-versus-host disease // *J. Clin. Invest.* 2003. V. 112. № 1. P. 101-108.
124. Zhang Y., Joe G., Zhu J., Carroll R., et al. 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. V. 103. № 10. P. 3970-3978.
125. Chen B. J., Cui X., Sempowski G. D., Liu C., et al. Transfer of allogeneic CD62L-memory T cells without graft-versus-host disease // *Blood*. 2004. V. 103. № 4. P. 1534-1541.
126. Dutt S., Tseng D., Ermann J., George T. I., et al. Naive and memory T cells induce different types of graft-versus-host disease // *J. Immunol.* 2007. V. 179. № 10. P. 6547-6554.
127. Chen B. J., Deoliveira D., Cui X., Le N. T., et al. Inability of memory T cells to induce graft-versus-host disease is a result of an abortive alloresponse // *Blood*. 2007. V. 109. № 7. P. 3115-3123.
128. Zheng H., Matte-Martone C., Li H., Anderson B. E., et al. Effector memory CD4⁺ T cells mediate graft-versus-leukemia without inducing graft-versus-host disease // *Blood*. 2008. V. 111. № 4. P. 2476-2484.
129. Zheng H., Matte-Martone C., Jain D., McNiff J., et al. Central memory CD8⁺ T cells induce graft-versus-host disease and mediate graft-versus-leukemia // *J. Immunol.* 2009. V. 182. № 10. P. 5938-5948.
130. Li N., Matte-Martone C., Zheng H., Cui W., et al. Memory T cells from minor histocompatibility antigen-vaccinated and virus-immune donors improve GVL and immune reconstitution // *Blood*. 2011. V. 118. № 22. P. 5965-5976.

131. Chan W. K., Suwannasaen D., Throm R. E., Li Y., et al. Chimeric antigen receptor-redirected CD45RA-negative T cells have potent antileukemia and pathogen memory response without graft-versus-host activity // *Leukemia*. 2015. V. 29. № 2. P. 387-395.
132. Fernández L., Fernández A., Mirones I., Escudero A., et al. GMP-compliant manufacturing of NKG2D CAR memory T cells using CliniMACS Prodigy // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. № P. 2361.
133. Langmead B., Salzberg S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // *Nat. Methods*. 2012. V. 9. № 4. P. 357-359.
134. Rodrigues Bento J., Meester J., Luyckx I., Peeters S., et al. The genetics and typical traits of thoracic aortic aneurysm and dissection // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2022. V. 23. № 1. P. 223-253.
135. Halford Z., Coalter C., Gresham V., Brown T. A systematic review of blinatumomab in the treatment of acute lymphoblastic leukemia: Engaging an old problem with new solutions // *Ann. Pharmacother.* 2021. V. 55. № 10. P. 1236-1253.
136. Lee J. H., Lee B. H., Jeong S., Joh C. S.-Y., et al. Single-cell RNA sequencing identifies distinct transcriptomic signatures between PMA/ionomycin- and α CD3/ α CD28-activated primary human T cells // *Genomics Inform.* 2023. V. 21. № 2. P. e18.
137. Ukrainskaya V., Rubtsov Y., Pershin D., Podoplelova N., et al. Antigen-specific stimulation and expansion of CAR-T cells using membrane vesicles as target cell surrogates // *Small*. 2021. V. 17. № 45. P. e2102643.
138. Kalinin R. S., Ukrainskaya V. M., Chumakov S. P., Moysenovich A. M., et al. Engineered removal of PD-1 from the surface of CD19 CAR-T cells results in increased activation and diminished survival // *Front. Mol. Biosci.* 2021. V. 8. № P. 745286.
139. Matesan M., Fisher D. R., Wong R., Gopal A. K., et al. Biokinetics of radiolabeled monoclonal antibody BC8: Differences in biodistribution and dosimetry among hematologic malignancies // *J. Nucl. Med.* 2020. V. 61. № 9. P. 1300-1306.
140. Matthews D. C., Martin P. J., Nourigat C., Appelbaum F. R., et al. Marrow ablative and immunosuppressive effects of ^{131}I -anti-CD45 antibody in congenic and H2-mismatched Murine transplant models // *Blood*. 1999. V. 93. № 2. P. 737-745.

141. Orozco J. J., Kenoyer A., Balkin E. R., Gooley T. A., et al. Anti-CD45 radioimmunotherapy without TBI before transplantation facilitates persistent haploidentical donor engraftment // *Blood*. 2016. V. 127. № 3. P. 352-359.
142. Castiello M. C., Bosticardo M., Sacchetti N., Calzoni E., et al. Efficacy and safety of anti-CD45-saporin as conditioning agent for RAG deficiency // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2021. V. 147. № 1. P. 309-320.e6.
143. Ludwig D., Bryan R., Dawicki W., Geoghegan E. M., et al. Preclinical development of an Actinium-225-labeled antibody radio-conjugate directed against CD45 for targeted conditioning and radioimmunotherapy // *Blood*. 2019. V. 134. № Supplement_1. P. 5601-5601.
144. Watanabe N., Mo F., Zheng R., Ma R., et al. Feasibility and preclinical efficacy of CD7-unedited CD7 CAR T cells for T cell malignancies // *Mol. Ther.* 2023. V. 31. № 1. P. 24-34.
145. Huang J., Alexey S., Li J., Jones T., et al. Unique CDR3 epitope targeting by CAR-T cells is a viable approach for treating T-cell malignancies // *Leukemia*. 2019. V. 33. № 9. P. 2315-2319.
146. Li Y., Lee H.-H., Jiang V. C., Che Y., et al. Potentiation of apoptosis in drug-resistant mantle cell lymphoma cells by MCL-1 inhibitor involves downregulation of inhibitor of apoptosis proteins // *Cell Death Dis.* 2023. V. 14. № 11. P. 714.
147. Hill K. S., Schuler E. E., Ellingson S. R., Kolesar J. M. Artesunate acts through cytochrome c to inhibit growth of pediatric AML cells // *Sci. Rep.* 2023. V. 13. № 1. P. 22383.
148. Barnett K. R., Mobley R. J., Diedrich J. D., Bergeron B. P., et al. Epigenomic mapping reveals distinct B cell acute lymphoblastic leukemia chromatin architectures and regulators // *Cell Genom.* 2023. V. 3. № 12. P. 100442.
149. Laskowski T. J., Biederstädt A., Rezvani K. Natural killer cells in antitumour adoptive cell immunotherapy // *Nat. Rev. Cancer.* 2022. V. 22. № 10. P. 557-575.
150. Glienke W., Esser R., Priesner C., Suerth J. D., et al. Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells // *Front. Pharmacol.* 2015. V. 6. № P. 21.

151. Moscarelli J., Zahavi D., Maynard R., Weiner L. M. The next generation of cellular immunotherapy: Chimeric antigen receptor-natural killer cells // *Transplant. Cell. Ther.* 2022. V. 28. № 10. P. 650-656.
152. Giri B., Gupta V. K., Yaffe B., Modi S., et al. Pre-clinical evaluation of Minnelide as a therapy for acute myeloid leukemia // *J. Transl. Med.* 2019. V. 17. № 1. P. 163.
153. Yu F., Chen Y., Zhou M., Liu L., et al. Generation of a new therapeutic D-peptide that induces the differentiation of acute myeloid leukemia cells through A TLR-2 signaling pathway // *Cell Death Discov.* 2024. V. 10. № 1. P. 51.
154. Varkey A., Batistick M., Bariana M., Anuncio S., et al. B cell maturation antigen (BCMA) as a novel and promising target for immunotherapy for acute myeloid leukemia // *Transplant. Cell. Ther.* 2024. V. 30. № 2. P. S6.
155. Koeffler H. P., Golde D. W. Human myeloid leukemia cell lines: a review // *Blood.* 1980. V. 56. № 3. P. 344-350.
156. 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. V. 40. № 10. P. 5329-5341.
157. Budde L. E., Berger C., Lin Y., Wang J., et al. 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. V. 8. № 12. P. e82742.
158. Kieback E., Charo J., Sommermeyer D., Blankenstein T., et al. A safeguard eliminates T cell receptor gene-modified autoreactive T cells after adoptive transfer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. V. 105. № 2. P. 623-628.
159. Stepanov A. V., Kalinin R. S., Shipunova V. O., Zhang D., et al. Switchable targeting of solid tumors by BsCAR T cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2022. V. 119. № 46. P. e2210562119.
160. Stepanov A. V., Xie J., Zhu Q., Shen Z., et al. 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. V. 8. № 5. P. 529-543.

161. Wang X., Chang W.-C., Wong C. W., Colcher D., et al. A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells // *Blood*. 2011. V. 118. № 5. P. 1255-1263.
162. Caimi P. F., Pacheco Sanchez G., Sharma A., Otegbeye F., et al. Prophylactic tocilizumab prior to anti-CD19 CAR-T cell therapy for non-Hodgkin lymphoma // *Front. Immunol.* 2021. V. 12. № P. 745320.
163. Maschan M., Caimi P. F., Reese-Koc J., Sanchez G. P., et al. Multiple site place-of-care manufactured anti-CD19 CAR-T cells induce high remission rates in B-cell malignancy patients // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 7200.
164. Zou F., Lu L., Liu J., Xia B., et al. Engineered triple inhibitory receptor resistance improves anti-tumor CAR-T cell performance via CD56 // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 4109.
165. Lee Y.-H., Lee H. J., Kim H. C., Lee Y., et al. PD-1 and TIGIT downregulation distinctly affect the effector and early memory phenotypes of CD19-targeting CAR T cells // *Mol. Ther.* 2022. V. 30. № 2. P. 579-592.
166. Cao Y., Lu W., Sun R., Jin X., et al. Anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells in combination with nivolumab are safe and effective against relapsed/refractory B-cell non-hodgkin lymphoma // *Front. Oncol.* 2019. V. 9. № P. 767.
167. Chong E. A., Alanio C., Svoboda J., Nasta S. D., et al. Pembrolizumab for B-cell lymphomas relapsing after or refractory to CD19-directed CAR T-cell therapy // *Blood*. 2022. V. 139. № 7. P. 1026-1038.
168. Mussai F., Wheat R., Sarrou E., Booth S., et al. Targeting the arginine metabolic brake enhances immunotherapy for leukaemia // *Int. J. Cancer.* 2019. V. 145. № 8. P. 2201-2208.
169. Fultang L., Booth S., Yogev O., Martins da Costa B., et al. Metabolic engineering against the arginine microenvironment enhances CAR-T cell proliferation and therapeutic activity // *Blood*. 2020. V. 136. № 10. P. 1155-1160.
170. Chen J., López-Moyado I. F., Seo H., Lio C.-W. J., et al. NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours // *Nature*. 2019. V. 567. № 7749. P. 530-534.

171. Seo H., Chen J., González-Avalos E., Samaniego-Castruita D., et al. TOX and TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8⁺ T cell exhaustion // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2019. V. 116. № 25. P. 12410-12415.
172. Lynn R. C., Weber E. W., Sotillo E., Gennert D., et al. c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance // *Nature.* 2019. V. 576. № 7786. P. 293-300.
173. Agarwal S., Aznar M. A., Rech A. J., Good C. R., et al. Deletion of the inhibitory co-receptor CTLA-4 enhances and invigorates chimeric antigen receptor T cells // *Immunity.* 2023. V. 56. № 10. P. 2388-2407.e9.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Таблица 5 – Используемые в работе МкАТ с флуоресцентными метками

Наименование	Производитель	Каталожный номер
<i>Античеловеческие</i>		
CD45-APC-Cy7	Sony Biotechnology, США	2120070
CD45-PerCP	BD Biosciences, США	345809
CD45-BV786	BD Biosciences, США	563716
CD45-PE-Vio 615	Miltenyi Biotec, Германия	130-110-777
CD4-FITC	Biolegend, США	317416
CD4-APC-Cy7	Thermo Fisher Scientific, США	A15441
CD4-APC-A750	Beckman Coulter, США	A94682
CD4-KO525	Beckman Coulter, США	A96417
CD8a-PE	Biolegend, США	300908
CD8a-PE-Cy7	Beckman Coulter, США	6607102
CD45	Abcam, США	ab214437
GAPDH	Abcam, США	ab185059
CD137-APC	Biolegend, США	309810
CD137-APC-Cy7	Biolegend, США	309830
IL2-APC-Cy7	Biolegend, США	500342
IFN γ -PE-Cy7	Biolegend, США	502528
CD45RA-PE	Biolegend, США	304108
CD45RA-APC	Miltenyi Biotec, Германия	130-109-777
CD62L-APC	Biolegend, США	304810
CD62L-BV711	BD Biosciences, США	740783
CD27-FITC	Biolegend, США	356404
CD197-PE	Miltenyi Biotec, Германия	130-120-463
CD95-PE	Biolegend, США	305608
CD44-APC	Biolegend, США	397506
CD3-APC	Biolegend, США	300312
CD3-FITC	Biolegend, США	317306

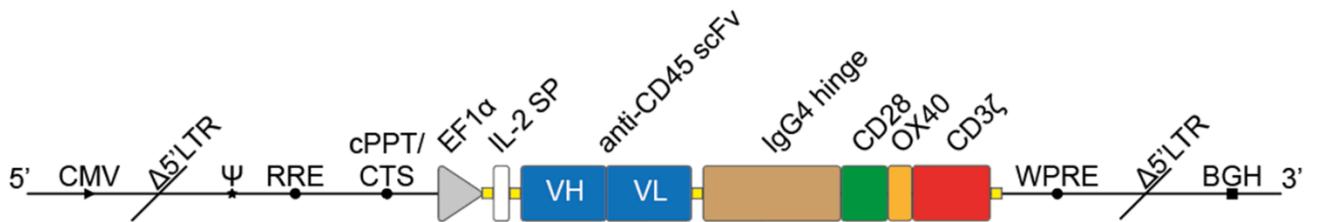
CD3-KO525	Beckman Coulter, США	B00068
CD3-VioGreen	Miltenyi Biotec, Германия	130-113-142
CD107a-PE	BD Biosciences, США	555801
TIGIT-APC	Biologend, США	372706
TIM3-PE	Biologend, США	345006
PD-1-FITC	Biologend, США	329904
LAG3-FITC	Biologend, США	369308
LAG3-PE-Cy7	Biologend, США	369208
CD56-BV510	BD Biosciences, США	563041
IgG Fc-DyLight 650 (использовали для детекции CAR45)	Invitrogen, США	SA5-10137
CD19 CAR Detection (использовали для детекции CAR19)	Miltenyi Biotec, Германия	130-129-550
<i>Антимышинные</i>		
CD45-PE	Sony Biotechnology, США	1115530
<i>Антикроличы</i>		
IgG-HRP	Sigma, США	A0545-1ML

Приложение Б

Таблица 6 – Результаты анализа неспецифической активности Cas9, направленной gRNA2

Целевой ген	Позиция в геноме	Часть гена	Значение CFD	Тип нуклеазной активности	№	Протегения с инсерциями и делециями. %								
						Электропорация с gRNA-2				Электропорация без gRNA-2				
						4 ч	8 ч	16 ч	4 ч	8 ч	16 ч	4 ч	8 ч	16 ч
PTPRC	chr1:198639272	экзон	1.00	Целевая (on-target)	-	73,70	83,80	90,60	1,50	1,70	1,60	1,60	1,60	1,60
GRAICH4	chr1:156594924	экзон	0.50		#1	1,20	1,10	1,20	1,10	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20
CHST10[NMS	chr2:100451099	некодируемая	0.27		#2	1,30	1,30	1,30	1,30	1,20	1,20	1,30	1,20	1,30
SNORD18[AC096559.1	chr2:12066072	некодируемая	0.22		#3	0,70	0,70	0,70	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,70
AC107057.1[LINCO1248	chr2:5579273	некодируемая	0.30		#4	1,70	1,90	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,90
OSBPL6	chr2:178393480	интрон	0.22		#5	0,90	0,80	0,80	0,90	1,00	1,00	0,90	1,00	0,90
NFKBIZ	chr3:101846553	интрон	0.29		#6	1,20	1,20	1,20	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,20
ATR	chr3:142500133	интрон	0.29		#7	2,80	2,90	2,80	2,90	2,70	2,70	2,90	2,70	2,80
TADA2B	chr4:7053277	экзон	0.15		#8	0,80	0,70	0,80	0,80	0,70	0,70	0,80	0,70	0,70
CTD-3179p9.2[CTD-2281M20.1	chr5:118371920	некодируемая	0.21		#9	1,20	1,10	1,20	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,20
SLC25A48	chr5:135872223	экзон	0.01		#10	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
AL391416.1[ME1	chr6:83396465	некодируемая	0.25		#11	1,80	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,80
FBXL4	chr6:98871971	экзон	0.00		#12	0,80	0,80	0,80	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,80
AC000099.1	chr7:127222790	интрон	0.42	Вне целевая (off-target)	#13	0,30	0,40	0,30	0,20	0,30	0,30	0,20	0,30	0,30
PLEKHA8	chr7:30088697	интрон	0.41		#14	0,70	0,70	0,90	0,60	0,70	0,70	0,60	0,70	0,70
GPR141[NME8	chr7:37836988	некодируемая	0.32		#15	0,40	0,40	0,50	0,40	0,50	0,40	0,40	0,50	0,40
PVT1	chr8:127986989	интрон	0.22		#16	0,80	0,70	0,80	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
PSD3[AC100800.2	chr8:18576436	некодируемая	0.31		#17	1,20	1,10	1,20	1,10	1,10	1,00	1,10	1,00	1,00
TMEM25	chr11:118532157	экзон	0.05		#18	1,30	1,30	1,30	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40
DCHS1[RP11-732A19.5]DCHS1	chr11:6624643	некодируемая	0.24		#19	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,60	0,70	0,60	0,70
SLC39A9	chr14:6942114	интрон	0.26		#20	3,00	3,90	3,70	3,50	2,70	2,70	3,50	2,70	3,20
APBA2	chr15:29051738	интрон	0.25		#21	1,60	1,70	1,70	1,70	1,60	1,60	1,70	1,60	1,60
THSD4[THSD4[RP11-112318.1	chr15:71504541	интрон	0.69		#22	1,40	1,50	1,70	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,30
HSPA13[SAMSN1	chr21:14430803	некодируемая	0.50		#23	0,80	1,20	0,70	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
CDKL5	chrX:18433674	интрон	0.47		#24	1,60	0,80	1,40	1,30	1,40	1,40	1,30	1,40	1,40

Приложение В



■ уникальные сайты рестрикции

Рисунок 53 – Схема лентивирусного вектора, несущего ген CAR45; CMV (cytomegalovirus) – цитомегаловирусный конститутивно активный промотор; LTR (long terminal repeat) – длинные концевые повторы, необходимые для встраивания лентивируса в геном клетки; Ψ – сигнал сборки вирусных частиц; RRE (Rev response element) – элемент ответа Rev, усиливающий ядерный экспорт мРНК транскриптов; cPPT/CTS (central polypurine tract/central termination sequence) – центральный полипуриновый тракт/центральная терминирующая последовательность, которые усиливают ядерный импорт лентивирусного генома; EF1 α (elongation factor alpha 1) – человеческий фактор элонгации 1 альфа, который является конститутивно активным промотором; IL-2 SP (interleukin-2 signal peptide) – сигнальная последовательность гена ИЛ-2 человека; anti-CD45 scFv (single-chain variable fragment of CD45 antibody) – одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела к человеческому CD45; VH (variable heavy chain) – вариабельный фрагмент тяжелой цепи антитела; VL (variable light chain) – вариабельный фрагмент легкой цепи антитела; IgG4 hinge (immunoglobulin G4 hinge) – шарнирная область CAR, которая содержит участок последовательности иммуноглобулина G4 человека; CD28 – трансмембранная и внутриклеточная часть человеческого CD28, которые формируют трансмембранный и первый ко-стимулирующий домены CAR; OX40 – внутриклеточная часть человеческого CD134, которая формирует второй ко-стимулирующий домен CAR; CD3 ζ – внутриклеточная часть человеческого CD3 ζ , которая формирует домен активации CAR; WPRE (Woodchuck posttranscriptional regulatory element) – регуляторный элемент, повышающий ядерный экспорт мРНК транскриптов; BGH (bovine growth hormone polyadenylation signal) – сигнал остановки трансляции.