

На правах рукописи

Беловежец Татьяна Николаевна

**Оценка эффективности CAR T- и CAR NK-клеток в
доклинических моделях В-клеточных
онкогематологических заболеваний человека**

1.5.3. Молекулярная биология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск, 2026

Работа выполнена в лаборатории инженерии антител Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Горчаков Андрей Александрович**, кандидат биологических наук, Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск

Оппоненты: **Моисеев Иван Сергеевич**, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры гематологии, трансфузиологии и трансплантологии с курсом детской онкологии ФПО имени профессора Б. П. Афанасьева Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И. П. Павлова, г. Санкт-Петербург

Друцкая Марина Сергеевна, доктор биологических наук, профессор РАН, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр «Институт иммунологии» ФМБА России, г. Москва

Защита состоится: 22.06.2026 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.082.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН (630090, Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 8/2, тел. (383)-373-02-49, e-mail: ovant@mcb.nsc.ru С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН https://www.mcb.nsc.ru/diss_council/autoref
Автореферат разослан « ____ » _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

О.В. Антоненко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Уровень пятилетней выживаемости при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе (В-ALL) в 80-х годах XX века составлял всего 50%, однако к началу двухтысячных он увеличился до 67%. Это стало возможным благодаря новым достижениям в химиотерапии и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). К сожалению, дальнейший прогресс в этой области замедлился и за период 2010-2017 гг. пятилетняя выживаемость увеличилась только до 72%. Стало очевидно, что потенциал химиотерапии и ТГСК используется почти полностью и следующие шаги в этой области должны опираться на новые технологии, в том числе на клеточную иммунотерапию.

Именно поэтому активное развитие получила CAR T-клеточная терапия. Данный вид терапии основан в настоящее время на использовании собственных Т-лимфоцитов пациента, генетически модифицированных для экспрессии химерных антигенных рецепторов (chimeric antigen receptor, CAR). Химерный антигенный рецептор – это искусственный трансмембранный белок, внеклеточная часть которого несет функцию распознавания целевого антигена, а внутриклеточная – функцию передачи активирующего Т-клетку сигнала. В качестве антигенраспознающей части CAR, как правило, используют VH и VL домены антител, объединенные гибким линкером (формат scFv), либо иные белки с аффинностью к антигену. Внутриклеточная область CAR чаще всего заимствована от активирующих и ко-стимулирующих молекул, таких как CD3 ζ , CD28, 4-1BB и др. При контакте CAR Т-лимфоцита с опухолевой клеткой антигенраспознающая часть CAR связывается с белком-мишенью на поверхности опухолевой клетки. Этот процесс запускает каскад сигналов от внутриклеточной части CAR и приводит к активации CAR Т-лимфоцита и лизису мишени. Таким образом, CAR объединяет в себе специфичность антител и цитотоксический потенциал Т-клеток, позволяя перенаправить цитотоксичность собственных Т-клеток пациента на новые мишени.

Внедрение CAR T-клеточной терапии позволило предоставить дополнительные опции для пациентов с рецидивирующими и резистентными формами В-ALL, а также с агрессивными формами В-клеточных лимфом, которые до этого имели очень низкие шансы на выживание. В то же время, уже накопленные данные проведенных клинических испытаний показали, что часть пациентов не отвечает на CAR T-клеточную терапию в полной мере. Чаще всего причиной таких неудач было либо возникновение мутантного опухолевого клона (лишённого целевого белка-мишени, к которому специфичны CAR Т-клетки), либо сниженный срок жизни и функционирования CAR Т-клеток в организме пациента.

Наиболее перспективные белки-мишени для CAR T-терапии В-ALL и других новообразований В-клеточного происхождения (например, неходжкинских лимфом, NHL) – это CD19, CD20 и CD22. Поскольку эти

белки в норме присутствуют также и на нормальных В-лимфоцитах, в ходе CAR T-клеточной терапии всё В-лимфоцитарное звено оказывается уничтоженным. Наступившее в результате состояние В-клеточной аплазии может контролироваться медикаментозно, и, как правило, полное восстановление В-клеточного лимфопоэза происходит в течение нескольких месяцев. Несмотря на тысячи публикаций и регистрацию на сегодняшний день семи CAR T-клеточных продуктов (одобренных FDA и EMA), не существует консенсуса относительно того, какой CAR считать «идеальным» для терапии В-ALL и NHL, притом, что именно структура CAR является наиболее значимой для обеспечения оптимальной функциональности CAR T-клеток и долговременного противоопухолевого контроля.

Таким образом, создание новых CAR, выбор оптимальной модульной структуры, а также использование альтернативных клеточных носителей для перехода к аллогенному формату CAR-терапии являются перспективными и актуальными направлениями исследований, которые обладают не только выраженным трансляционным потенциалом, но и могут служить фундаментальной основой для более глубокого понимания механизмов устойчивости к противоопухолевой терапии и консолидации заболевания. Настоящая работа ставит своей целью создание нескольких вариантов CAR к маркерам В-клеточных неоплазий CD19 и CD20, в том числе в биспецифическом варианте, а также исследует потенциал NK-клеточных носителей и модифицированных векторных конструкций.

Степень разработанности проблемы. За последние 25 лет опубликованы тысячи работ, направленных на изучение взаимосвязей между архитектурой, модульным составом и аффинностью CAR, условиями культивирования и фенотипическим составом CAR T-клеток, эффективностью и токсичностью CAR-клеточных продуктов, как в доклинических, так и в клинических исследованиях. В мире проводится большое количество фундаментальных исследований, направленных на изучение процессов активации и истощения CAR T-клеток, поиска новых мишеней, выявления оптимальных вариантов дизайна CAR и создания альтернативных клеточных платформ: CAR NK-клеток, CAR-макрофагов и CAR-экзосом.

Цель исследования: создание и характеристика CAR, специфичных к маркерам В-клеточных неоплазий, а также исследование возможности применения альтернативных клеточных носителей и “усиленных” векторных конструкций для CAR.

Задачи исследования:

1. Получить CD20-специфические CAR T-клетки человека на основе scFv Leu16, 1F5 и 2F2 и провести сравнительный анализ таких CAR T-клеток *in vitro* и *in vivo*.
2. Получить CAR T-клетки, специфичные одновременно к CD19 и CD20, и провести их характеристику в тестах *in vitro*.

3. Получить CD20-специфические CAR NK-92, YT и KHYG-1 клеточные линии и провести сравнение их активности в тестах *in vitro* и *in vivo*.
4. Выбрать оптимальную фермент/субстратную пару для проведения *in vivo* визуализации в животных моделях ксенотрансплантированных опухолей с использованием люминометрии.
5. Создать и провести сравнение прототипов "усиленных" CAR-NK-клеток человека, несущих различные активационно-индуцируемые репортеры.

Научная новизна. В работе впервые проведено детальное функциональное и фенотипическое сравнение трех CD20-специфичных антигенраспознающих доменов CAR в идентичном контексте. Для этого впервые в России были разработаны CAR на основе последовательностей одноцепочечных варибельных фрагментов (scFv) CD20-специфических моноклональных антител 1F5, Leu16 и 2F2, а также получены биспецифичные и дуальные варианты CAR различной структуры, обеспечивающие *in vitro* и *in vivo* активность CAR T-клеток на уровне, не уступающем современным мировым стандартам. Также впервые в России проведено сравнение трех NK-клеточных линий человека, NK-92, KHYG-1, YT-1, - в качестве носителей CAR на модели лимфомы Беркитта, ксенотрансплантированной мышам линии *NOD/scid*. Полученные CAR NK-клеточные линии охарактеризованы по уровню экспрессии CAR и цитотоксичности против опухолевых клеток. Впервые показано, что CAR NK-клетки на основе линии KHYG-1 достоверно увеличивают продолжительность жизни мышей с ксенотрансплантированными опухолями.

Теоретическая и практическая ценность.

Для исследований *in vivo* создана технологическая платформа по визуализации ксенотрансплантированных опухолей на основе фермент/субстратной пары NLuc/h-целентеразин. Таким образом, в ходе работы созданы предпосылки для дальнейшей модификации структуры полученных CD20-специфических CAR на основе человеческого антитела 2F2 и их тестирования в клинических испытаниях у больных с CD20-позитивными неоплазиями. Также, исходя из полученных результатов, можно утверждать, что CAR NK-клеточные платформы, основанные на первичных NK-клетках и NK-клеточных линиях, обладают потенциалом в качестве универсальной терапии онкологических заболеваний человека.

Положения, выносимые на защиту:

1. CAR на основе последовательностей CD20-специфического человеческого антитела 2F2 обеспечивают эффективное уничтожение опухолевых В-клеток и являются перспективным решением для проведения доклинических и клинических испытаний.

2. По сравнению с другими протестированными NK-клеточными линиями, CAR NK-клеточная линия KHYG-1, специфичная к CD20, обладает выраженным противоопухолевым эффектом *in vivo* на модели ксенотрансплантированной лимфомы Беркитта и может являться прототипом для создания универсальных CAR NK-клеток. В то же время, известные промоторные модули могут быть успешно применены в контексте Т-клеток, но не обеспечивают необходимого уровня индуцируемости "усиленных" CAR NK-клеточных линий.
3. Протестированная фермент/субстратная пара NanoLuc/h-целентеразин может успешно применяться для количественного определения и биораспределения опухолевых клеток *in vivo* с использованием системы прижизненной визуализации.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Томск, на площадке открытых коммуникаций OpenBio-2017, наукоград Кольцово, Новосибирская область, на XII, XIII, XIV, XV и XVI Международных симпозиумах памяти Р.М. Горбачевой "Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Генная и клеточная терапия", Санкт-Петербург, на VIII всероссийской конференции с международным участием "Актуальные вопросы доклинических и клинических исследований лекарственных средств, биомедицинских клеточных продуктов и клинических испытаний медицинских изделий", симпозиум "Генная и клеточная терапия", Санкт-Петербург, на IV Инновационном Петербургском медицинском форуме, Санкт-Петербург, на научной школе-конференции "Молекулярные основы заболеваний: что молекулярная биология может сделать для современной медицины", Новосибирск, на IX всероссийской конференции с международным участием "Актуальные вопросы доклинических и клинических исследований лекарственных средств и клинических испытаний медицинских изделий", Санкт-Петербург, на VI Конгрессе гематологов и III Конгрессе трансфузиологов России, Москва, на конференции Российского общества онкогематологов "Клеточная иммунотерапия в лечении онкогематологических заболеваний у взрослых", Москва.

Вклад автора. Автор диссертационной работы участвовала в разработке всех этапов диссертационной работы, в формулировании целей и задач, получении, анализе и обсуждении экспериментальных данных, а также в подготовке научных публикаций. Автор самостоятельно проводила молекулярные и клеточные эксперименты (получала необходимые плазмидные конструкции, получала, культивировала и характеризовала первичные CAR Т-клетки и NK-клеточные линии, получала модели ксенотрансплантированных опухолей на мышцах линий *NOD/scid* и *NSG*, анализировала результаты при помощи проточной цитометрии). Прижизненную визуализацию ксенотрансплантированных опухолей проводил Д.В. Гладких (ИХБФМ СО РАН). Получение высокоочищенных

препаратов плазмидной ДНК проводил А. М. Наякшин. А. А. Горчаков участвовал в создании плазмидных конструкций и планировании экспериментальных работ. Плазмидные конструкции для тестирования активационно-индуцируемых промоторов получены А. Х. Сабировым.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, а также выводов и списка цитируемой литературы, в которые входит 507 ссылок. Работа изложена на 134 страницах машинописного текста, содержит 7 таблиц, 29 рисунков и приложение на 1 странице.

Публикации по теме диссертации. По материалам диссертации опубликовано 5 работ в журналах, включенных в базы Scopus и Web of Science, также имеется 3 публикации тезисов конференций.

Благодарность. Автор выражает признательность д.б.н А. В. Степанову за предоставленную клеточную линию Raji-ffluc, а также Д.В. Гладких и чл.-кор. РАН, проф., д.б.н. М. А. Зенковой (ИХБФМ СО РАН) за поддержку проведения экспериментов по прижизненной визуализации животных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы включает семь разделов и заключение. Описаны наиболее распространенные заболевания В-клеточной природы и подходы к их лечению, как стандартные, широко применяющиеся в клинической практике, так и новые, недавно одобренные и/или находящиеся на стадии клинических испытаний. Всесторонне описана CAR T-клеточная терапия и ее преимущества перед другими видами терапии. Большая часть обзора посвящена характеристике модулей, входящих в состав CAR, а также проблемам и перспективам CAR-терапии.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Методы молекулярной биологии. В работе использованы стандартные методы молекулярной биологии: выделение и очистка плазмидной и геномной ДНК и РНК (фенол-хлороформная экстракция и выделение коммерческими наборами), ПЦР, гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции, лигирование, электротрансформация клеток бактерий *E. coli* и секвенирование полученных плазмидных конструкций по Сэнгеру.

Культуры клеток, использованные в исследовании, и методы работы с ними. В работе использовали как иммортализованные клеточные линии человека, полученные из АТСС: НЕК293Т (эмбриональная эпителиальная линия клеток почки), Raji (линия клеток лимфомы Беркитта), Nalm6 (линия клеток ALL), Jurkat (линия Т-клеточной лимфомы), УТ-1, НК-92, КНУГ-1 (линии НК-клеточной лимфомы), так и первичные Т-клетки здоровых доноров. Использовались стандартные методы работы с культурами клеток млекопитающих: трансфекция, геномная интеграция целевых кассет при помощи лентивирусной доставки, проточная цитометрия, выделение первичных мононуклеаров из крови здоровых

доноров. Кроме того, использовались методы для полной характеристики и проверки свойств, полученных CAR T- и НК-клеточных продуктов: активационный тест, оценка уровня моментальной и повторяющейся цитотоксичности, анализ скорости пролиферации и определение субпопуляционного состава полученного CAR T-клеточного продукта.

Методы работы с животными. Для проверки полученных CAR T- и НК-клеток в тестах *in vivo* использовались стандартные методы работы с лабораторными животными – иммунодефицитными мышами линии NSG и *NOD/scid*: ксенотрансплантация опухолевых клеток, прижизненная визуализация, анализ приживаемости опухолей и причин смерти.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Получение конструкций для создания CD20-специфичных CAR с различными антигенраспознающими районами

Для сравнения и выбора наиболее перспективного CAR были выбраны три scFv от CD20-специфичных антигенраспознающих районов, заимствованных от антител 2F2, 1F5 и Leu16. Исходя из небольшого размера самого белка CD20, нами был выбран короткий шарнирный район длиной 45 а.о., заимствованный от белка CD8a. Нуклеотидная последовательность, кодирующая каждый из трех CAR (сигнальный пептид, антигенраспознающий модуль, шарнирный, трансмембранный и сигнальный домены в формате единой полипептидной цепочки) была клонирована под контролем промотора гена *EF1a* в лентивирусный вектор серии pCDH (CD530, SystemBio, США), обеспечивающий стабильную интеграцию целевых последовательностей ДНК в хромосомы выбранных клеток. Для дополнительного контроля эффективности трансдукции в качестве репортера использовался укороченный вариант белка NGFR человека, кодирующая последовательность которого была присоединена при помощи IRES-элемента.

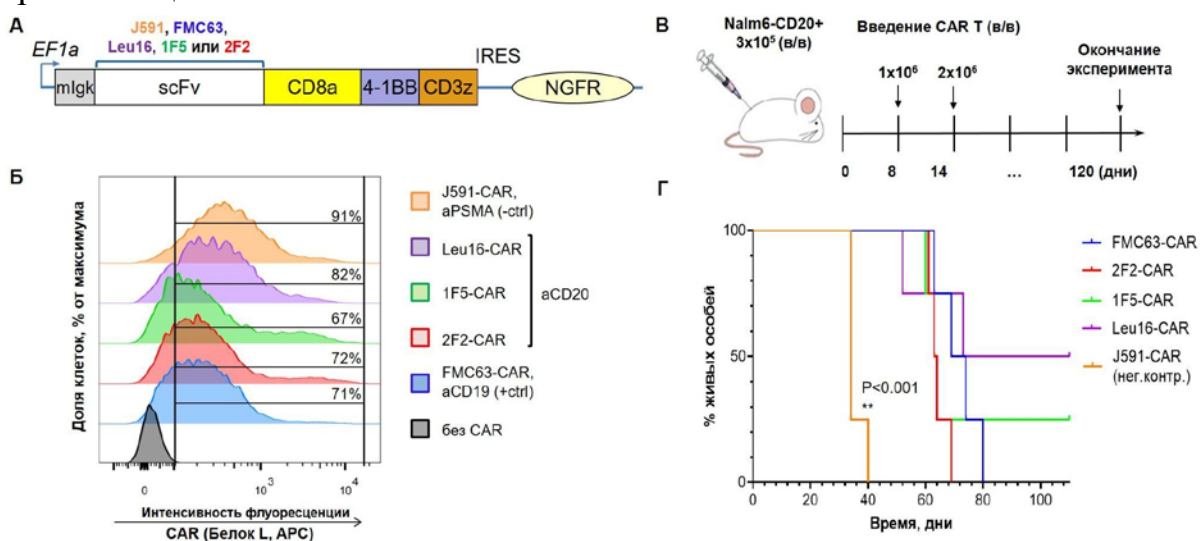


Рисунок 1. А – Модульная организация CAR, используемых в сравнении, Б – использованный в работе протокол обеспечивает сравнимый уровень трансдукции первичных Т-клеток здоровых доноров и высокий уровень поверхностной экспрессии для всех тестируемых CAR, как следует из данных проточной цитометрии при детекции

CAR с помощью конъюгата белка L/APC (приведены репрезентативные данные для одного из доноров). В – Схема эксперимента. Г – Введение 1F5- и Leu16-CAR Т-клеточных продуктов приводит к увеличению продолжительности жизни мышей с ксенотрансплантированной опухолью Nalm6-CD20 по сравнению с другими CAR Т-клеточными продуктами. Все CD20-специфичные CAR Т-клеточные продукты достоверно увеличивают выживаемость в эксперименте *in vivo* в сравнении с нерелевантными PSMA-специфичными CAR Т-клетками. Статистический анализ был выполнен с использованием метода Каплана-Майера с последующим логарифмическим ранговым тестом (тест Мантеля-Кокса, n=5, GraphPad Prism, v6, ** – p<0,001).

Таким образом, для работы с первичными Т-клетками человека были получены лентивирусные конструкции, кодирующие CAR с одним из трех CD20-специфичных scFv (2F2, 1F5 и Leu16). В качестве положительного контроля был воспроизведен CD19-специфический CAR на основе scFv от моноклонального антитела FMC63, идентичный используемому в коммерческом CAR Т-клеточном продукте Kymriah (Novartis). В качестве негативного нерелевантного контроля был получен PSMA-специфический CAR на основе scFv J591 (PSMA характерен для эпителиальных клеток простаты и клеток рака простаты, но отсутствует на поверхности В-клеток человека) (Рис. 1А).

1.2. Характеризация полученных CAR Т-клеток в тестах *in vitro*

Для более корректного сравнения всех полученных CAR были выделены Т-клетки четырех здоровых доноров (медиана возраста 30 лет), после чего при помощи лентивирусной трансдукции в Т-клетки были доставлены кассеты, кодирующие CAR. Верификацию экспрессии проводили при помощи проточной цитометрии, окрашивая полученные CAR Т-клеточные продукты флуоресцентно меченым белком L, связывающим легкие цепи антител (Рис. 1Б). Для измерения уровня цитотоксичности было использовано два протокола, являющиеся стандартными для характеристики новых CAR – это тесты на моментальную и на повторяющуюся цитотоксичность. В тесте на моментальную цитотоксичность CAR Т-клетки инкубируют с клетками-мишенями 4 часа в различных соотношениях эффектор:мишень (Е:Т), после чего производится подсчет мертвых клеток-мишеней. В данном тесте не было обнаружено достоверных отличий между CD20-специфичными и контрольным CD19-специфичными CAR Т-клетками в отношении клеток-мишеней Nalm6-CD20, несущих CD19 и CD20 на своей поверхности, и все они проявляли достоверно более высокий уровень цитотоксичности по сравнению с нерелевантным CAR (Рис. 2А).

Тест на повторяющуюся цитотоксичность считается более строгим и релевантным, поскольку он чуть более точно моделирует сложные взаимодействия между CAR Т-клетками и опухолевыми клетками в организме, а именно хроническую стимуляцию CAR Т-клеток антигеном, и позволяет исключить те варианты CAR, которые приводят к

преждевременному функциональному истощению CAR Т-клеток (Mamonkin et al. 2015). В таком варианте постановки теста все CAR Т-клеточные продукты демонстрируют статистически значимо более высокую цитотоксичность. Несмотря на то, что достоверных отличий между CD19/20-специфическими CAR не было обнаружено, 1F5-CAR обнаруживал тенденцию к утрате контроля над опухолевыми клетками после 8 дня (Рис. 2Б).

В совокупности представленные данные показывают, что все полученные CD19- и CD20-специфические CAR Т-клетки проявляют сравнимую друг с другом и достоверно большую цитотоксичность *in vitro*, чем нерелевантные контрольные CAR Т-клетки.

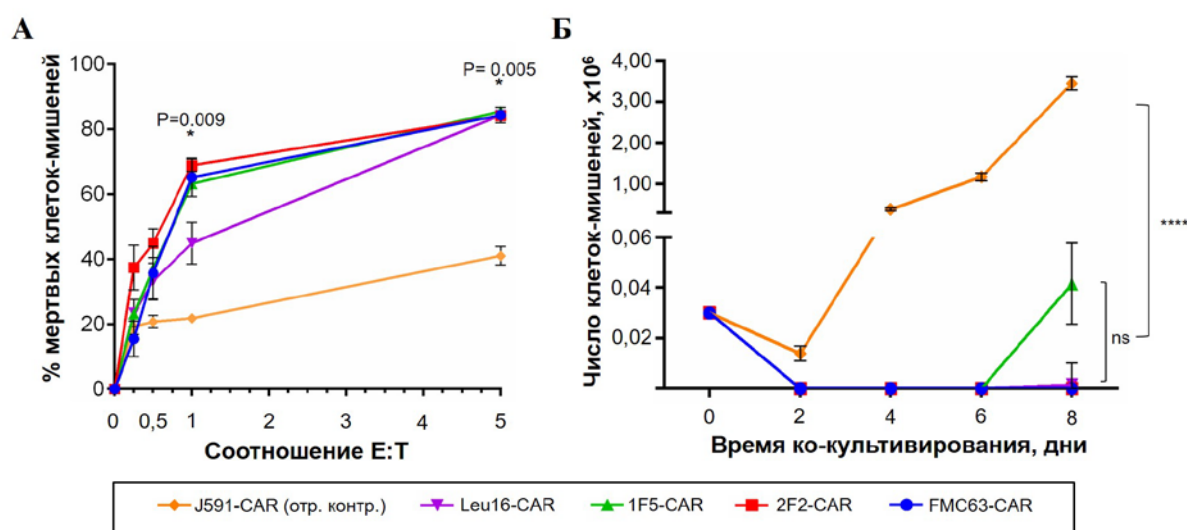


Рисунок 2. А – CD19- и CD20-специфичные CAR Т-клетки (Е) проявляют схожие уровни цитотоксичности против клеток-мишеней (Т) Nalm6-CD20 (CD19+, CD20+) через 4 часа совместного культивирования в различных соотношениях Е:Т. В качестве негативного контроля были использованы нерелевантные PSMA-специфичные J591-CAR Т-клетки. Б – CD19- и CD20-специфичные CAR Т-клетки проявляют сравнимые уровни цитотоксичности в тесте на повторяющуюся цитотоксичность. В качестве негативного контроля были использованы нерелевантные PSMA-специфичные J591-CAR Т-клетки. Показаны средние значения количества клеток с указанием диапазона. Статистический анализ был выполнен при помощи множественного сравнения с использованием двухфакторного анализа (2-way ANOVA, n=8, GraphPad Prism, v6, ns – статистически не значимо, **** – p< 0,001).

1.3. Характеризация полученных CAR Т-клеток на модели ксенотрансплантированной опухоли Nalm6-CD20 в эксперименте *in vivo*

Для проверки функциональности полученных CAR Т-клеток и сравнения их в тестах *in vivo* описано множество подходов, в которых варьируют как дозу ксенотрансплантируемых опухолевых клеток, так и дозу и сроки введения CAR Т-клеток. Нами была выбрана схема эксперимента, в котором экспериментальным животным системно вводят опухолевые клетки, а CAR Т-клетки вводят таким образом, что 100%

животных с привитыми опухолями в группе положительного контроля (FMC63-CAR) в конечном итоге погибают.

Для этого 6-8 недельным самкам мышей линии NSG внутривенно вводили по $3 \cdot 10^5$ клеток линии Nalm6-CD20, являющейся стандартной моделью ALL (Karalewitz et al. 2022). На 8 сутки мыши получали терапию CAR Т-клетками, доза в $3 \cdot 10^6$ клеток на животное была разбита на 2 введения: на 8 и 14 сутки от момента ксенотрансплантации, такой подход используется в клинической практике для обеспечения безопасности пациента (Рис. 1В) (Shah et al. 2020). В качестве негативного контроля использовали нерелевантные J591-CAR Т-клетки, специфичные к PSMA, в качестве положительного контроля FMC63-CAR Т-клетки, специфичные к CD19 (Рис. 1А).

Все CAR Т-клеточные продукты достоверно увеличивали продолжительность жизни мышей по сравнению с нерелевантным контролем. Достоверных отличий между CD19- и CD20-специфическими CAR Т-клетками выявлено не было, однако Leu16- и 1F5-CAR обнаруживают тенденцию к более полному контролю над опухолью (Рис. 1Г).

1.4. Создание В-клеточной линии Nalm6-Nluc-sopGFP для прижизненной визуализации опухолевой нагрузки и ответа на терапию

Оценка общей выживаемости является важным параметром при исследовании новых CAR, однако для более полной характеристики важно иметь возможность наблюдать динамику изменений опухолевой нагрузки во время терапии. Система прижизненной визуализации IVIS Spectrum позволяет проводить количественную детекцию люминесцентного и флуоресцентного сигнала и оценивать, как суммарную опухолевую нагрузку, так и ее локализацию в теле животного в динамике, являясь золотым стандартом для доклинических исследований новых клеточных продуктов. Вместе с тем, известно, что интенсивность люминесценции наиболее часто распространенных люцифераз может быть недостаточной, что затрудняет детекцию малого количества клеток. Кроме того, используемые субстраты этих люцифераз являются мало стабильными, что также затрудняет проведение исследований. Альтернативным вариантом может стать люцифераза Nluc (NanoLuc), имеющая крайне скромные размеры (19 кДа), высокую стабильность в широком диапазоне температур и значений pH и обладающая высокой удельной интенсивностью люминесценции, приблизительно в 150 раз превышающей Fluc и Rluc. Сдерживающими факторами для использования этого фермента являются низкая растворимость, биодоступность и высокая токсичность субстрата – фуримазина. Для преодоления данных ограничений нами было предложено использовать в качестве альтернативного субстрата h-целентеразин.

Было проведено сравнение двух вариантов целентеразина – нативного целентеразина и h-целентеразина – с фуримазином в тесте *in vitro*, для этого при помощи лентивирусной трансдукции нами была создана клеточная линия Nalm6-Nluc-copGFP со стабильной экспрессией одновременно люциферазы Nluc и зеленого флуоресцентного белка copGFP (для дополнительной возможности детектирования клеток при помощи проточной цитометрии) (Рис. 3). С использованием данной клеточной линии мы также показали возможность использования пары NLuc/h-целентеразин для прижизненной визуализации диссеминированных опухолевых клеток с помощью системы IVIS Spectrum (Perkin-Elmer, США) (Рис. 4).

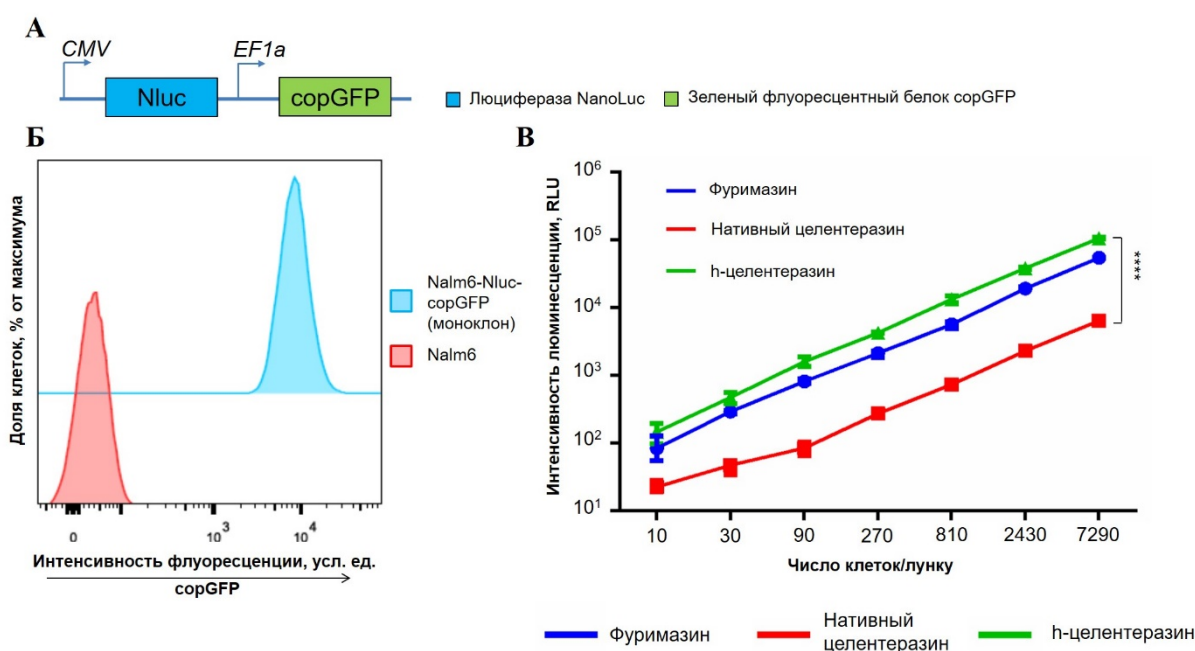


Рисунок 3. А – схематичное изображение кассеты, кодирующей люциферазу NanoLuc и зеленый флуоресцентный белок copGFP. Б – анализ флуоресценции моноклональной клеточной линии Nalm6-Nluc-copGFP при помощи проточной цитометрии. В – сравнение интегральных интенсивностей люминесценции за 25 секунд при использовании различных субстратов (10 мкМ) в зависимости от числа клеток Nalm6-Nluc-copGFP. Статистический анализ отличий между группами выполняли с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA) с поправкой на множественные сравнения (n=3, GraphPad Prism, v6, **** – p < 0,001).

1.5 Создание и характеристика *in vitro* CAR, специфичных одновременно к CD19 и CD20

Зачастую причиной неудачи терапии CAR Т-клетками является ускользание опухолевых клеток из-под контроля за счет снижения уровня экспрессии или изменения самой мишени, на которую нацелен CAR (Shah and Fry 2019; Ruella et al. 2023). Одним из вариантов решения такой проблемы является создание CAR, содержащих в своем составе несколько антигенраспознающих доменов. Для проверки функциональности таких рецепторов были созданы варианты кассет, кодирующих CAR, схематично

изображенные на рисунке 5А, где в качестве антигенраспознающих доменов были использованы последовательности scFv FMC63 (aCD19) и 2F2 (aCD20). Затем были получены псевдотипированные лентивирусные частицы, которыми трансдуцировали первичные Т-клетки здорового донора, и эффективность трансдукции находилась в пределах 50-70% (Рис. 5Б).

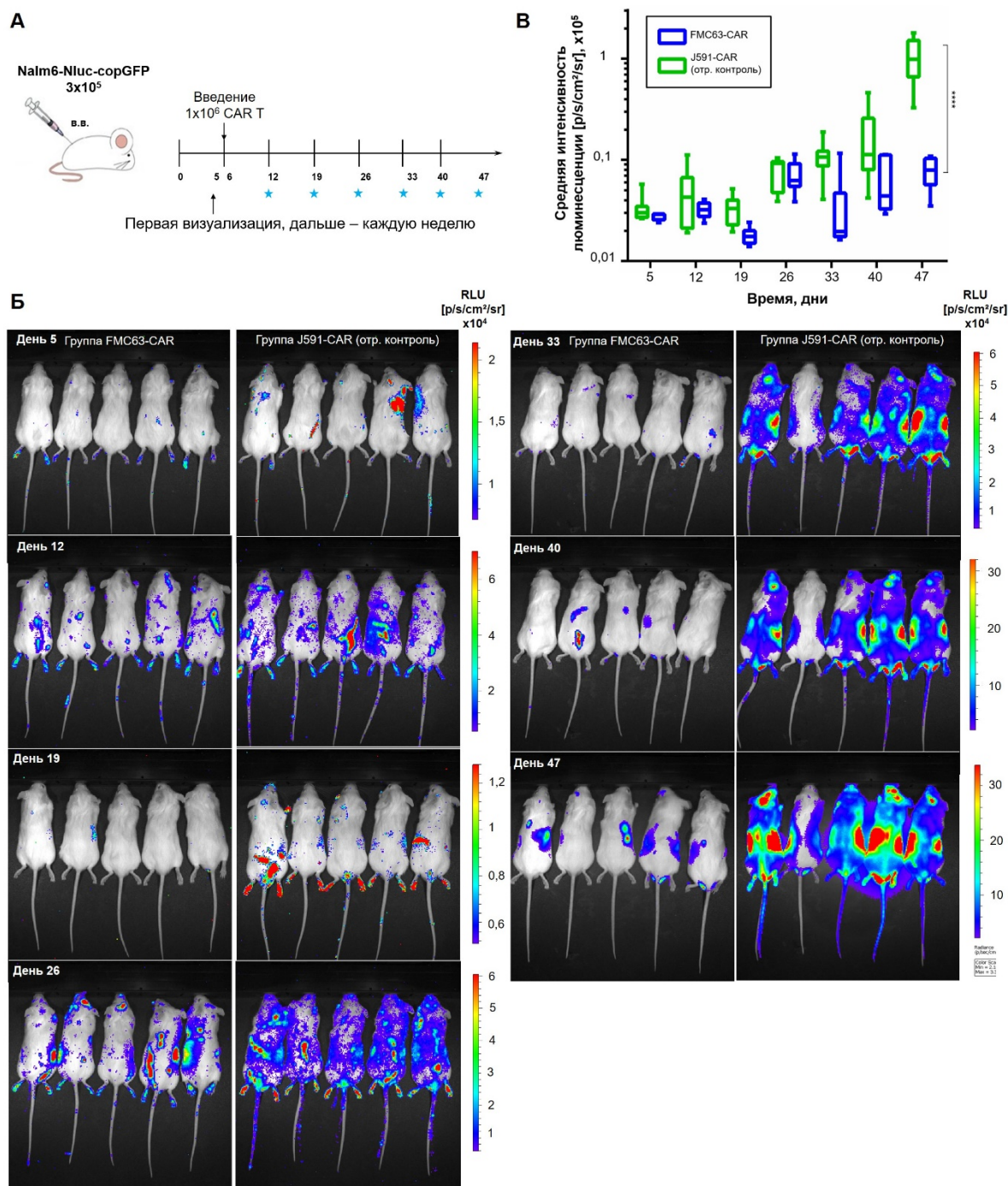


Рисунок 4. А – схема эксперимента. Б – *in vivo* визуализация после интраперитонеального введения 0,491 мкмоль (20 мкг) h-целентеразина в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS). Спектральные данные были получены в течение 3 минут, через 5 минут после введения субстрата. Репрезентативные изображения приведены для 5 из 7 мышей в каждой группе. В – Динамика изменения относительной

интенсивности люминесценции от времени после введения, в каждой группе животных (n=7). На 47-й день интенсивность люминесценции статистически значимо различалась, статистический анализ выполняли с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA) с поправкой на множественные сравнения (Prism, v6, **** – p<0,001).

В тесте на повторяющуюся цитотоксичность против клеток-мишеней Nalm6-CD20 было обнаружено, что наибольший противоопухолевый контроль обеспечивается моноспецифичными CAR T-клетками, сопоставимую эффективность демонстрируют "дуальные" CAR T-клетки с конструкцией dualCAR, несколько хуже при длительном совместном культивировании уничтожают опухоли CAR T-клетки с конструкцией revbiCAR, а варианты dualCAR_2P и biCAR теряют функциональность *in vitro*, начиная с 5 дня (Рис. 5Б).

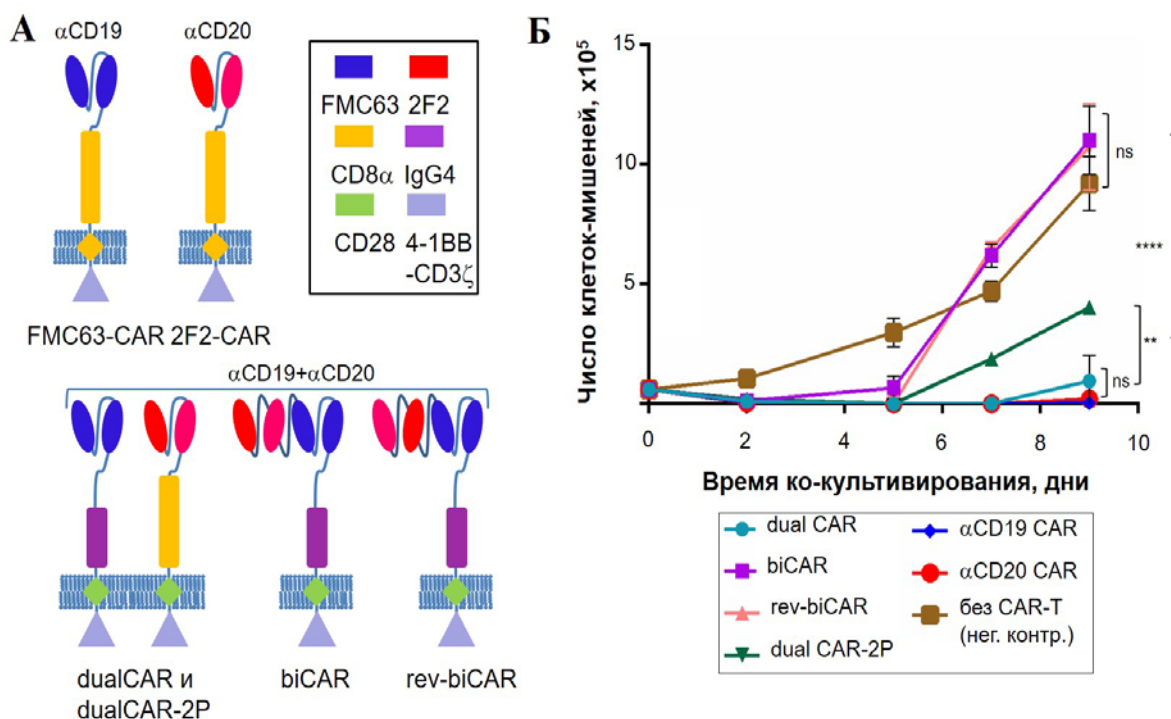


Рисунок 5. А – Структура моно- и биспецифичных CAR. Б – В тесте на повторяющуюся цитотоксичность моноспецифичные CAR T-клетки и dualCAR T-клетки проявляют более высокий уровень цитотоксичности, чем биспецифические варианты. Показаны средние значения количества клеток с указанием диапазона. Статистический анализ выполняли с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA) с поправкой на множественные сравнения (n=6, GraphPad Prism, v6, ns – не достоверно, ** – p < 0,01, **** – p < 0,001).

Таким образом, более сложные варианты конструкций CAR обладают большим потенциалом, однако они требуют серьезной структурной оптимизации, прежде чем можно переходить к их тестированию на моделях опухолей с гетерогенной экспрессией антигенов (а именно, опухолей, где часть клеток не несет CD19 или CD20) и на моделях *in vivo*.

1.6 Полученные CD20-специфические CAR NK-клеточные линии достоверно увеличивают продолжительность жизни мышей линии *NOD/Scid* с ксенотрансплантированной опухолью Raji-ffluc

Для исследования нами были выбраны три NK-клеточные линии: YT, NK-92 и KHYG-1. С использованием плазмидной конструкции, кодирующей CAR состава Leu16-IgG1-CD28-CD3z, были получены лентивирусные частицы и трансдуцированы клетки всех трех линий. Для обеспечения гомогенности CAR NK-клеточных продуктов и нормализации уровней поверхностной экспрессии CAR, трансдуцированные клетки были отсортированы при помощи клеточного сортера и использованы в дальнейших экспериментах. В первую очередь мы охарактеризовали полученные линии по уровню цитотоксичности *in vitro*. Полученные данные свидетельствуют о том, что все CAR NK-клеточные линии обладают CAR-опосредованной специфичностью к CD20, при этом в отличие от CAR YT, клетки линий CAR NK-92 и CAR KHYG-1 более активно уничтожают клетки-мишени при высоких соотношениях эффектор:мишень (Е:Т).

Наблюдаемая нами способность клеток CAR NK-92 обеспечивать CAR-зависимый лизис клеток-мишеней *in vitro* отнюдь не гарантирует того, что данная активность будет проявляться *in vivo* и обеспечивать эффективный противоопухолевый контроль. Помимо множества факторов, определяющих различное распределение и тропизм введенных NK-клеточных линий, эффективность таких клеток *in vivo* значительно ограничена необходимостью их облучения перед введением для снижения пролиферативного потенциала и риска приживления. Таким образом, в отличие от CAR Т-клеток, которые многократно делятся после введения, CAR NK-клеточные линии необходимо вводить или большой дозой (до $10^{10}/\text{м}^2$), или несколько раз (Suck et al. 2016; Vahidian et al. 2022). Для проверки полученных CAR NK-клеточных линий *in vivo* в модели ксенотрансплантированной опухоли были использованы клетки линии Raji-ffluc, которые экспрессируют CD20 на характерном для В-клеточных неоплазий уровне, а также люциферазу светлячка Fluc (Stepanov et al. 2018), что позволило нам проводить прижизненную визуализацию опухолевой нагрузки с помощью прибора IVIS (Perkin Elmer).

В эксперименте 6-10-недельным мышам линии *NOD/Scid* внутривенно вводили по 5×10^5 опухолевых клеток Raji-ffluc, после чего на 5, 11 и 16 сутки вводили по 5×10^6 предварительно облученных дозой 10 Гр CAR NK-клеточных линий. Далее оценивали общую выживаемость и проводили визуализацию. Контрольной группе вводили PBS в качестве терапии. В данном эксперименте не было выявлено статистически значимых отличий от отрицательного контроля в группах CAR YT и CAR NK-92, хотя, CAR NK-92 продемонстрировали тенденцию к контролю опухоли. Однако введение клеток линии CAR KHYG-1 достоверно увеличило время жизни животных с ксенотрансплантированной опухолью.

1.7 Возможности для получения “усиленных” CAR-клеток

На сегодняшний день все более заметное место в ландшафте CAR T-клеточных продуктов занимают так называемое “четвертое” поколение рецепторов, которые секретируют дополнительные цитокины или другие “усиливающие” молекулы (Rafiq et al. 2020). Для оценки принципиальной возможности создания “усиленных” CAR NK-клеточных линий, способных продуцировать целевые молекулы в ответ на CAR-опосредованную активацию, нами были получены 9 лентивирусных конструкций, кодирующих репортерный белок mCherry под контролем различных промоторных элементов. Выбранные промоторные кассеты состояли из мультимеров сайтов связывания NFAT и NFκB, а также соответствовали промотору и проксимальному энхансеру гена *CD69* человека (Рис. 6). Анализ активности таких геномно-интегрированных репортеров обнаружил, что для CAR NK-клеточных линий NK-92 и YT, экспрессирующих модельный PSMA-специфический CAR второго поколения состава SP (mIgK)-scFv(J591)-IgG1hinge (CH2-CH3)-CD28TM-CD28cyto-CD3z(cyto) (Kulemzin et al. 2018), ни одна из протестированных кассет не обеспечивает достаточно высокого соотношения экспрессии в присутствии и в отсутствие активации. При этом, в контексте T-клеток, как и ожидалось, происходила активационно-опосредованная экспрессия репортера для конструкций, несущих 4xNFAT, 10 или 30 сайтов связывания NFκB или промоторно-энхансерный фрагмент регуляторной зоны гена *CD69*. Полученные отрицательные данные позволили сделать вывод о целесообразности проведения непредвзятых скринингов гораздо большего числа синтетических и нативных промоторных элементов для создания “усиленных” CAR NK-клеточных линий, поскольку, по всей видимости, сигнальные пути NK-клеток при их искусственной активации через CAR отличаются от канонического TCR-опосредованного сигналинга T-клеток.

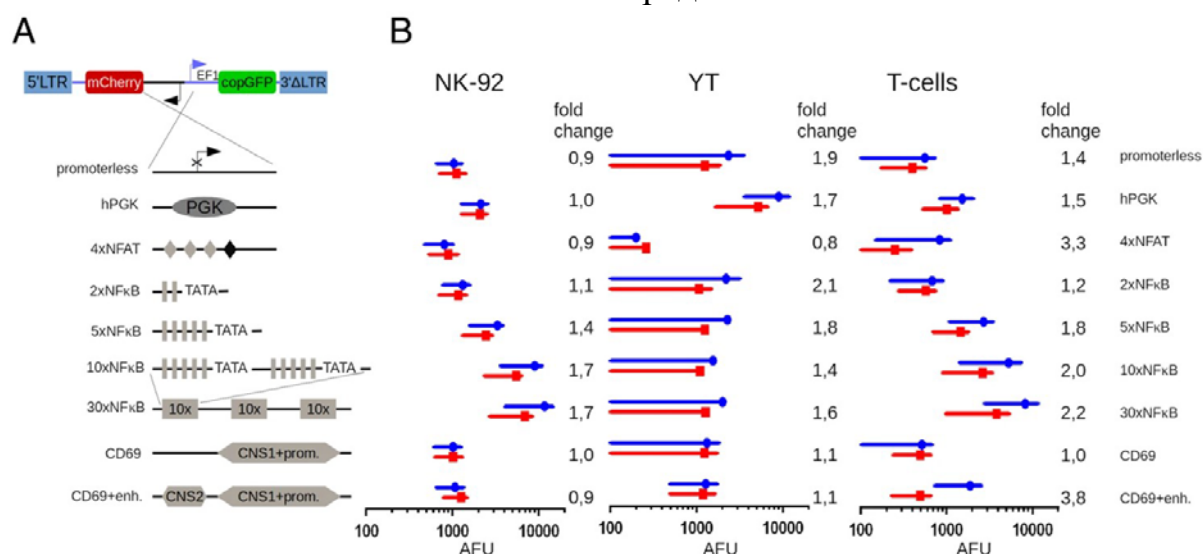


Рисунок 6. Анализ активности хромосомно-интегрированных промоторов, индуцированных активацией, в CAR NK-92, CAR YT и T-клетках. А – Схема лентивирусного вектора для проверки различных вариантов промоторов, Б –

Нормализованные на сорGFP значения флуоресценции репортера mCherry в клетках CAR NK-92 и CAR YT, коинкубированных с клетками-мишенями HEK293T-PSMA+ (синий) или изогенными контрольными клетками (HEK293T, красный). Аналогично показаны значения, наблюдаемые для активированных aCD3/aCD28 частицами (синий) и покоящихся (красный) Т-клеток.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружено, что CD20-специфичные CAR Т-клетки проявляют цитотоксичность в отношении В-клеточных мишеней *in vitro* и обеспечивают выраженный противоопухолевый эффект *in vivo* на модели ксенотрансплантированной опухоли острого лимфобластного лейкоза Nalm6-CD20.
2. Установлено, что биолюминесцентная система на основе комбинации люциферазы NanoLuc и h-целентеразина обладает высокой чувствительностью *in vitro* и *in vivo* и позволяет проводить количественное определение и исследовать биораспределение опухолевых клеток в лабораторных животных.
3. Биспецифические анти-CD19/CD20 Т-клетки, экспрессирующие два независимых CAR, активно уничтожают клетки-мишени *in vitro*, причем как в условиях проявления краткосрочной цитотоксичности, так и в условиях хронической антигенной стимуляции.
4. Впервые полученная CAR-KHYG-1 NK-клеточная линия, специфичная к CD20, обеспечивает длительный противоопухолевый контроль и достоверно увеличивает продолжительность жизни мышей с ксенотрансплантированными клетками лимфомы Беркитта Raji-ffluc по сравнению с клеточными линиями CAR-NK-92 и CAR-YT.
5. Установлено, что использование минимального промотора гена *CD69* человека в сочетании с энхансерами CNS1 и CNS2 позволяет добиться индуцируемой экспрессии целевого гена в первичных Т-клетках.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Беловежец Т. Н.**, Гладких Д. В., Омельченко В. О., Волкова О.Ю., Таранин А.В., Кулемзин С.В. NanoLuc/h-целентеразин: эффективная пара для детекции биолюминесценции *in vitro* и *in vivo* // Гематология и трансфузиология. 2025. Т. 70, № 2. С. 146–155.
2. **Belovezhets T.**, Kulemzin S., Volkova O., Najakshin, A., Taranin, A., Gorchakov, A. Comparative Pre-Clinical Analysis of CD20-Specific CAR T Cells Encompassing 1F5-, Leu16-, and 2F2-Based Antigen-Recognition Moieties // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24, № 4. Art. 3698.
3. Kulemzin S., Evsyukov I., **Belovezhets T.**, Taranin A., Gorchakov A. Horses for courses in the era of CARs: Advancing CAR T and CAR NK cell therapies // J. Pers. Med. 2021. Vol. 11, № 11. Art. 1182.

4. Kulemzin S. V., Matvienko D. A., Sabirov A. H., **Belovezhets T.**, [et al.] Design and analysis of stably integrated reporters for inducible transgene expression in human T cells and CAR NK-cell lines // BMC Med. Genomics. 2019. Vol. 12, Suppl. 2. Art. 44.
5. **Беловежец Т. Н.**, Горчаков А. А., Самочерных К. А., Кулемзин С.В. Сравнительный анализ химерных антигенных рецепторов с двойной специфичностью к CD19 и CD20 // Российский журнал персонализированной медицины. 2024. Т. 4, № 5. С. 413–420.

Тезисы конференций:

1. **Belovezhets T. N.**, Gorchakov A. A., Kulemzin S. V., Chikaev A.N., Koval O.A., Kuligina E.V., Taranin A.V. Comparative in vitro analysis of human NK-cell lines expressing chimeric antigen receptors // Cellular Therapy and Transplantation. 2018. Vol. 7, № 3. P. 24–25.
2. **Беловежец Т. Н.** Сравнительный анализ in vitro активности Т-клеток с CD20-специфичным химерным антигенным рецептором на основе человеческого антитела офатумумаб // Cellular Therapy and Transplantation. 2019. Т. 8, № 3. С. 35–37.
3. **Беловежец Т. Н.**, Кулемзин С. В., Горчаков А. А. Разработка и тестирование новых CAR Т-клеточных продуктов в онкогематологии // Клиническая онкогематология. 2024. Т. 17, № S1. С. 11–12.

Автореф. дисс. на соискание учёной степени кандидата биологических наук.

Подписано в печать 14.04.2026.

Заказ №1025. Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз.

Отпечатано в типографии «АЛЕКСПРЕСС»

ИП Малыгин Алексей Михайлович

630090, Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, 6/1, оф. 104

Тел. (383) 217-43-46