

УДК 57.085.23

РЕГУЛИРОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ CAR-T КЛЕТОК ПО ОТНОШЕНИЮ К ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМ НОВООБРАЗОВАНИЯМ ПРИ ПОМОЩИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАРНАЗЫ С БАРСТАРОМ

© 2023 г. Р. С. Калинин^{1,*}, В. О. Шипунова¹, Ю. П. Рубцов¹, В. М. Украинская^{1,2},
А. А. Шульга¹, Е. В. Коновалова¹, Д. В. Волков¹, И. А. Ярошевич³, А. М. Мойсенович³,
А. А. Белогулов^{1,3}, Г. Б. Телегин¹, А. С. Чернов¹, М. А. Масчан²,
С. С. Терехов^{1,3}, В. Д. Кнорре¹, Е. Н. Хурс⁴, член-корреспондент РАН Н. В. Гнучев⁴,
академик РАН А. Г. Габибов^{1,3}, академик РАН С. М. Деев^{1,5}

Поступило 01.12.2022 г.

После доработки 14.12.2022 г.

Принято к публикации 14.12.2022 г.

CAR-T-специфическая терапия произвела революцию в современной онкологии. Однако, несмотря на выраженные терапевтические эффекты, новый подход имеет побочные эффекты, связанные со сложностью фармакокинетического и фармакодинамического контроля. Возникновение тяжелых осложнений у пациентов при CAR-T терапии инициировало серию исследований по регулированию активности CAR-T клеток *in vivo*. Для контроля цитотоксической противоопухолевой активности CAR-T клеток мы предлагаем применить уникальную белковую пару барназа-барстар. Для этого барназа была слита с анкириновыми повторами (дарпинами), специфичными к связанному с опухолью антигеном HER2 (рецептор 2 эпидермального фактора роста человека). Использование барстар-модифицированных CAR-T клеток вместе с молекулами на основе барназы продемонстрировало выраженные регуляторные эффекты нацеливания CAR.

Ключевые слова: взаимодействие барназы с барстаром, дарпины, CAR-T клетки, солидные опухоли

DOI: 10.31857/S2686738922600972, **EDN:** QFANKV

В течение последнего десятилетия разработка противоопухолевых препаратов на основе генетически модифицированных клеток крови чело-

века показала множество положительных результатов [1, 2]. Однако отсутствие контролируемой фармакокинетики и фармакодинамики вносит существенные ограничения в применение этого подхода из-за риска возникновения клинических побочных эффектов [3–6]. В последнее время были предприняты многочисленные попытки регулирования цитотоксичности CAR-T-клеток [7–9]. Некоторые из этих экспериментов были сосредоточены на привлечении одобренных FDA препаратов [10–14]. Специфическое белок-белковое взаимодействие может дать ключ к решению проблемы эффективной настройки цитотоксичности CAR-T клеток по отношению к опухолям. Суперсемейство РНКаз можно использовать в качестве источника белковых пар с их белковыми ингибиторами. Так, комплекс РНКазы (барназа)-барстар

¹ Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, Москва, Россия

² Национальный центр медицинских исследований
педиатрической гематологии, онкологии и иммунологии
им. Д. Рогачева, Москва, Россия

³ Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

⁵ Национальный исследовательский университет
“Высшая школа экономики”, Москва, Россия

*e-mail: Roman.Kalinin.93@yandex.ru

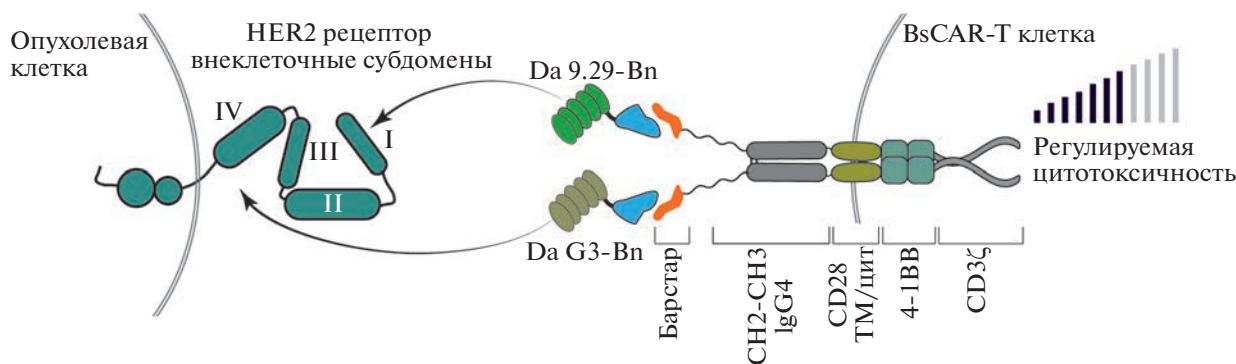


Рис. 1. Процесс регулирования специфического нацеливания на опухолевую клетку Т-клетки, модифицированную универсальным BsCAR, при помощи белка дарпин-барназа (Da-Bn). HER2 рецептор имеет 4 внеклеточных субдомена для мембранно-проксимального-IV специфичного Da G3-Bn, для мембранно-дистального I Da 9.29-Bn. Барназа с высоким сродством взаимодействует со своим ингибитором барстаром, который в конструкции CAR выполняет функцию распознающего домена. В качестве шарнира используется GGGSGGGSGGGS и CH2-CH3 IgG4, CD28 TM/цит = трансмембранный и цитоплазматический домены из CD28, 4-1BB = цитоплазматический домен активации из CD137, CD3ζ = цитоплазматический домен активации из CD3ζ.

характеризуется чрезвычайно прочным связыванием ($KD \sim 10^{-14}$) [15, 16]. Поэтому данная пара белков перспективна в применении для специфического нацеливания и регулирования цитотоксических противоопухолевых эффектов CAR-T клеток. Были созданы два типа конструкций: барназа, слитая с ранее разработанными белками анкириновых повторов (дарпинов), и CAR с барстаром (BsCAR) в качестве распознающего домена.

Здесь мы применили инновационный подход к специфическому нацеливанию CAR-T клеток, заменив широко используемые конструкции на основе суперсемейства Ig на пептидные каркасы [17]. Были разработаны дарпины, специфичные к HER2 (рецептор эпидермального фактора роста человека) (рис. 1). Были синтезированы гибридные белки анти-HER2 дарпины, слитые с барназой [18], которые использовали здесь в качестве молекул-посредников, направляющие BsCAR-T клетки против опухолевых клеток с гиперэкспрессией HER2. Дарпины могут связываться с разными доменами внеклеточной части рецептора HER2, дарпин 9.29 с мембранно-дистальным субдоменом I с $KD = 0.09$ нМ [19] и дарпин G3 с проксимальным субдоменом IV с $KD = 3.8$ нМ [18]. Нами была разработана схема экспериментов *in vivo* с голыми мышами BALB/c Nu (рис. 2).

Из данных, представленных на рис. 2, мы можем видеть, что предлагаемая система барназа-барстар специфически регулирует противоопухолевый цитотоксический эффект CAR-T терапии. Система может контролировать эффективность этой терапии, предотвращать осложнения CAR-T терапии и сопутствующие ей побочные эффекты.

Здесь мы показываем модульный подход CAR, основанный на универсальных CAR, который позволяет разделить два отдельных процесса: 1) распознавание антигена и 2) активация CAR-T клеток. На наш взгляд, данный процесс имеет перспективы с использованием различных агентов перенаправления. Что может привести к появлению платформы для CAR-T терапии, направленной на солидные опухоли.

МЕТОДЫ

Получение BsCAR-T клеток

Получение лентивирусной конструкции BsCAR, производство CAR-T клеток и определение уровня экспрессии BsCAR было описано ранее [20]. В экспериментах использовались BsCAR-T клеточные продукты с уровнем трансдукции 50% в первый цикл введения и 40% во второй цикл введения BsCAR-T клеток внутривенно иммунодефицитным мышам линии BALB/c Nu.

Эксперименты на мышах

Все процедуры с животными проводились в строгом соответствии с рекомендациями по надлежащему использованию и уходу за лабораторными животными. Проводимые действия были одобрены Институтом по уходу и использованию животных ИБХ РАН (номер протокола IACUC 729/20 от 18 февраля 2020 г.). Для экспериментов были взяты мыши-самки BALB/c Nu 8 нед, весом 20–24 г, предоставленные питомником лабораторных животных города Пушкино Московской области (коллекция лабораторных грызунов категории СПФ для фундаментальных, медико-биологических и фармакологических исследований,

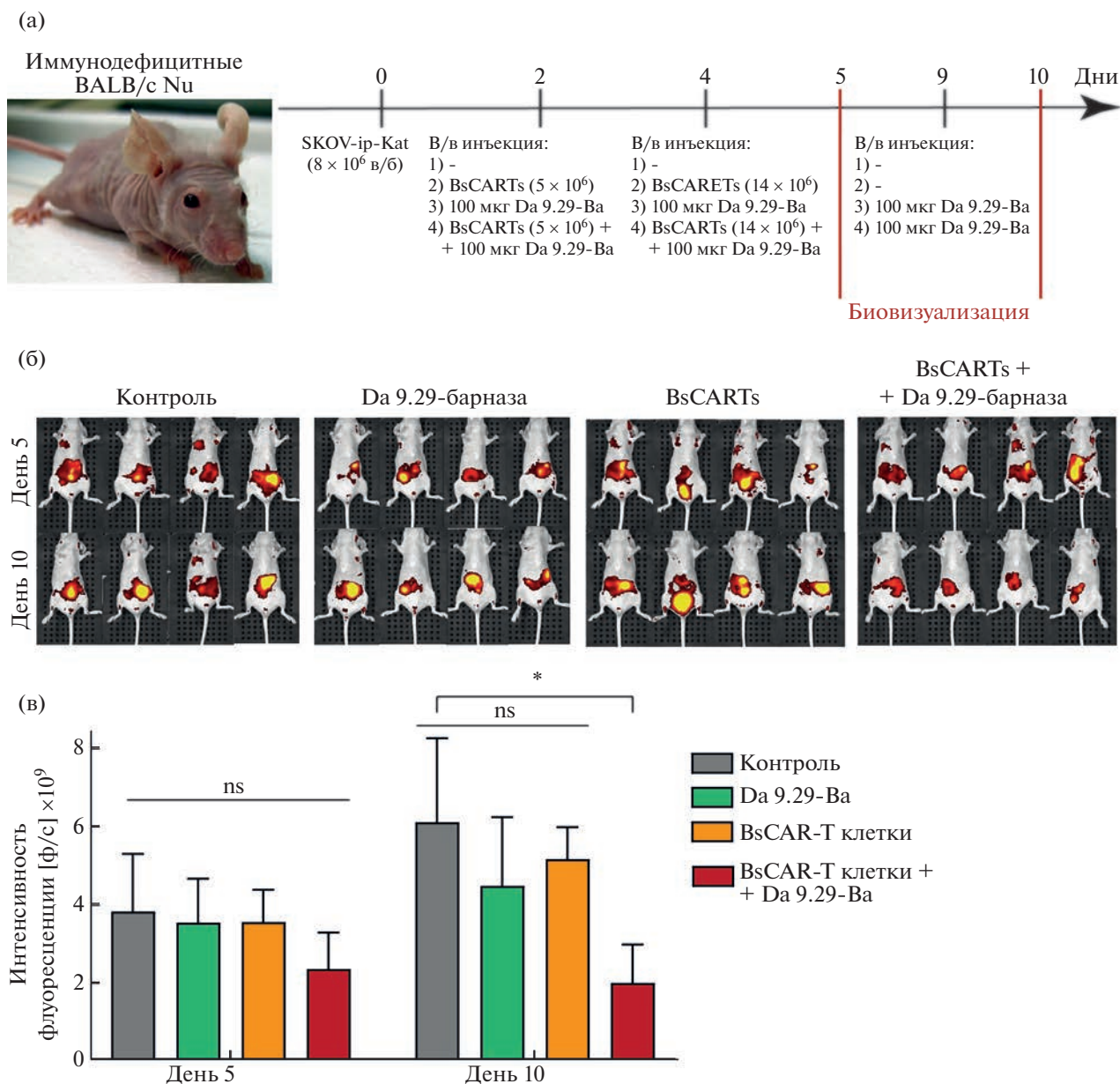


Рис. 2. BsCAR T-клетки совместно с введением молекул-посредников подавляют HER2-положительные опухоли *in vivo*. (а) Схема проведения эксперимента, где мышам Balb/c Nu (самки, 20–24 г) внутрибрюшинно вводили 8 млн клеток SKOV-ip-Kat, формирующих солидные опухолевые узлы в брюшине. Наличие в цитоплазме этих клеток, меченых красным флуоресцентным белком TurboFP635 (Kat), позволяет визуализировать рост и расположение опухолевых узлов у мышей *in vivo* с использованием компьютерной томографии IVIS SPectrum (Perkin Elmer, США). Внутривенно вводили на 2-й день 8 млн, на 4-й день 14 млн BsCAR-T клеток двум группам мышей: контрольной группе – BsCAR-T и экспериментальной – BsCAR-T + дарпин 9.29 – барназа. Терапию проводили внутрибрюшинным введением Da 9.29-Ba по схеме на рисунке. Визуализацию опухолей проводили на 5-е и 10-е сутки после введения клеток SKOV-ip-Kat. (б) Изображения IVIS животных, получавших BsCAR-T клетки отдельно или в сочетании с 9.29-барназой. Представлена флуоресценция опухолей отдельных мышей в каждой группе. (в) Опухолевая нагрузка, оцененная количественно как среднее значение флуоресценции в течение 5 и 10 дней. Данные были проанализированы с помощью критерия Манна–Уитни и представлены как среднее $\pm$ диапазон (range). Статистическая значимость: * $p < 0.05$.

Россия). Мышам интраперитонеально инокулировали 8×10^6 SKOV-ip-Kat клеток, разработанных ранее [21], в 60% матригеле в 100 мкл полной культуральной среды. На второй день мышам слу-

чайно распределяли по 4 группам по 4 особи. Животным из 2-й и 4-й группы внутривенно вводили 5×10^6 млн на 2-й день и 14×10^6 млн на 4-й день BsCAR-T клеток. Через 4 ч после инъек-

ции BsCAR-T клеток мышам начинали вводить внутривенно Да 9.29-барназу 100 мкг в 50 мкл PBS. Инъекцию Да 9.29-барназы повторили на 9-й день эксперимента. Через день измеряли вес мышей и на 5-й и 10-й день проводили прижизненную визуализацию IVIS Spectrum *in vivo* (Perkin-Elmer).

Методы и способы обработки результатов и проведения статистического анализа

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью пакета программ Prism 9 (GraphPad Software). Измерения значения флуоресценции опухоли были статистически обработаны с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и проанализированы с помощью критерия Манна-Уитни. Значения представлены как среднее значение $\pm$ диапазон (range) ($n = 4$). Статистическая значимость: $*p < 0.05$.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РНФ 17-74-30019 Структурные и кинетические особенности презентации антигенов как ключ к пониманию механизмов индукции аутоиммунных патологий и лимфомогенеза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weber E.W., Maus M.V., Mackall C.L., The Emerging Landscape of Immune Cell Therapies. *Cell*. 2020. V. 181. P. 46–62.
2. Stepanov A.V., et al., Autocrine-based selection of ligands for personalized CAR-T therapy of lymphoma. *Sci Adv* 2018. V. 4. P. eaau4580.
3. Turtle C.J., et al., Durable Molecular Remissions in Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells After Failure of Ibrutinib. *J Clin Oncol*. 2017. V. 35. P. 3010–3020.
4. Mancikova V., Smida M., Current State of CAR T-Cell Therapy in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2021. V. 22. P. 5536.
5. Калинин P.C., et al., Молекулярные подходы к безопасной и контролируемой Т-клеточной терапии. *Acta Naturae*. 2018. Т. 10. С. 16–23.
6. Schultz L.M., et al., Disease Burden Affects Outcomes in Pediatric and Young Adult B-Cell Lymphoblastic Leukemia After Commercial Tisagenlecleucel: A Pediatric Real-World Chimeric Antigen Receptor Consortium Report. *J Clin Oncol*. 2022. V. 40. P. 945–955.
7. Davila M.L., 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. P. 224ra25.
8. Schuster S.J., et al., Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med*. 2017. V. 377. P. 2545–2554.
9. Neelapu S.S., et al., Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2017. V. 377. P. 2531–2544.
10. Urbanska K., et al., A universal strategy for adoptive immunotherapy of cancer through use of a novel T-cell antigen receptor. *Cancer Res*. 2012. V. 72. P. 1844–1852.
11. Tamada K., et al., Redirecting gene-modified T cells toward various cancer types using tagged antibodies. *Clin. Cancer Res*. 2012. V. 18. P. 6436–6445.
12. Ma J.S.Y., et al., Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016. V. 113. P. E450–458.
13. Rodgers D.T., et al., Switch-mediated activation and re-targeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016. V. 113. P. E459–468.
14. Cho J.H., Collins J.J., Wong W.W., Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses. *Cell*. 2018. V. 173. P. 1426–1438.e11.
15. Hartley R.W., “[38] – Barnase–Barstar Interaction” in *Methods in Enzymology, Ribonucleases – Part A*, A.W. Nicholson, Ed. (Academic Press, 2001). P. 599–611.
16. Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Plückthun A., Design of multivalent complexes using the barnase*barstar module. *Nat Biotechnol*. 2003. V. 21. P. 1486–1492.
17. Tolmachev V.M., Chernov V.I., Deyev S.M., Targeted nuclear medicine. Seek and destroy. *Russ. Chem. Rev.* 2022. V. 91. P. RCR5034.
18. Steiner D., Forrer P., Plückthun A., Efficient selection of DARPins with sub-nanomolar affinities using SRP phage display. *J Mol Biol*. 2008. V. 382. P. 1211–1227.
19. Zahnd C., et al., A Designed Ankyrin Repeat Protein Evolved to Picomolar Affinity to Her2. *Journal of Molecular Biology*. 2007. V. 369. P. 1015–1028.
20. Stepanov A.V., et al., Switchable targeting of solid tumors by BsCAR T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022. V. 119. P. e2210562119.
21. Zdobnova T., et al., A novel far-red fluorescent xenograft model of ovarian carcinoma for preclinical evaluation of HER2-targeted immunotoxins. *Oncotarget*. 2015. V. 6. P. 30919–30928.

BARNASE-BARSTAR SPECIFIC INTERACTION REGULATES CAR-T CELLS CYTOTOXIC ACTIVITY TOWARD MALIGNANCY

Roman S. Kalinin^{a, #}, Victoria O. Shipunova^a, Yuri P. Rubtsov^a, Valeria M. Ukrainskaya^{a, b}, Alexey Schulga^a, Elena V. Konovalova^a, Dmitry V. Volkov^a, Igor A. Yaroshevich^c, Anastasiia M. Moysenovich^c, Alexey A. Belogurov^{a, c}, Georgij B. Telegin^a, Alexandr S. Chernov^a, Mikhail A. Maschan^b, Stanislav S. Terekhov^{a, c}, Vera D. Knorre^a, Elena Khurs^d, Corresponding Member of the RAS Nikolay V. Gnuchev^d, Academician of the RAS Alexander G. Gabibov^{a, c}, and Academician of the RAS Sergey M. Deyev^{a, e}

^a Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Moscow, Russian Federation

^c M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^d Engelhardt Institute of molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^e National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: Roman.Kalinin.93@yandex.ru

The development of CAR-T specific therapy made a revolution in modern oncology. Despite the pronounced therapeutic effects, this novel approach displayed several crucial limitations caused by the complications in pharmacokinetics and pharmacodynamics controls. The presence of the several severe medical complications of CAR-T therapy initiated a set of attempts aimed to regulate their activity in vivo. We propose to apply the barnase-barstar system to control the cytotoxic antitumor activity of CAR-T cells. To manage the regulation targeting effect of the system we propose to use barstar-modified CAR -T cells together with barnase-based molecules. Barnase was fused with designed ankyrin repeat proteins (DARPs) specific to tumor antigens HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) The application of the system demonstrates the pronounced regulatory effects of CAR-T targeting.

Keywords: Barnase-barstar interaction, DARPs, CAR T cells, solid tumors