

# **Разработка аллогенных опухоль-специфичных Т-лимфоцитов с химерным антигенным рецептором к антигену CD19 для терапии лимфопролиферативных злокачественных новообразований**

## **Актуальность исследования**

Противоопухолевые Т-лимфоциты с экспрессией химерного антигенного рецептора (CAR-T) на сегодняшний день имеют один из самых больших потенциалов в терапии онкологических заболеваний. Крупнейшие зарубежные биотехнологические компании (Novartis, Pfizer), небольшие специализированные компании (Juno Therapeutics) ведут разработки в области CAR-T терапии. Кроме того, десятки проводимых клинических испытаний доказывают эффективность CAR-T терапии. Для производства CAR-T при этом нет необходимости в больших производственных мощностях, а доклинические испытания данного клеточного продукта в России до настоящего времени были проведены единично. В ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России получены CAR-T, специфичные к CD19 антигену (Петухов А. В. и др. Получение CAR T-лимфоцитов, специфичных к CD19, и оценка их функциональной активности *in vitro* // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2018. – Т. 11. – №. 1.), которые нуждаются в доклинических испытаниях с целью дальнейшего продвижения данного терапевтического продукта в клиническую практику. Широко известны побочные эффекты возникающие при CAR-T терапии, в том числе цитокиновый шторм, приводящий к летальному исходу. Аллогенные Т-лимфоциты с химерным антигенным рецептором к антигену CD19 могут быть лишены побочных эффектов, быть безопасными, универсальными и экономически эффективными. По оценкам зарубежных фармакологических компаний стоимость аутогенной CAR-T терапии может достигать до 500 тысяч евро. Разрабатываемые нами подходы продукции аллогенных CAR-T позволят снизить стоимость терапии и усилить ее безопасность.

## **Научная платформа**

Онкология

## **Планируемый (ые) научные подразделения исполнители (с указанием руководителя исследования)**

Руководитель исследования – директор Института гематологии д.м.н. проф. Зарицкий А.Ю.

Исполнители:

Институт гематологии ФГБУ "НМИЦ им. В.А.Алмазова" Минздрава России

## **Ключевые слова**

ОМЛ, ХЛЛ, В-клеточные лимфомы, CAR-T

## **Цель проекта**

Разработка технологии, методов и необходимых генетических конструкций для модификации и экспансии первичных Т-лимфоцитов человека с целью экспрессии химерного рецептора, узнающего CD19 независимо от МНС, лишенных TCR и HLA. Другими словами: разработка универсальных CAR-T, подходящих любому пациенту. Проведение доклинических исследований токсичности и специфичности полученных CAR-T.

Преимуществом данного проекта является развитие технологии на территории Российской Федерации с применением отечественных препаратов в технологическом регламенте производства CAR-T. Кроме того, проект направлен на усиление безопасности и специфичности иммунотерапии генетически модифицированными T-лимфоцитами, направлен также на доступность препарата для онкобольных, как в отношении времени инъекции (отсутствие этапа получения персонифицированного препарата), так и в экономическом плане.

### **Задачи проекта**

Задача данного проекта - получение конечного продукта с заданными свойствами и изучение его ранее не ясных биологических характеристик. Проект направлен на поиск оптимального пути элиминации ТКР и МНС с сохранением свойств цитотоксичности T-лимфоцита и его жизнеспособности.

Ранее не было проведено сравнение получения аллогенных CAR-T и их характеристик при использовании различных подходов. Таких как белок-белковый нокдаун, shRNA нокдаун, нокаут, геномное редактирование. Кроме того, так как данная область исследований прежде всего направлена на практическое применение биотехнологические компании не спешат публиковать в научных изданиях все изученные ими технологии и свойства аллогенных CAR-T. Нами будет проведено такое сравнение и изучение получившегося продукта.

Потенциальный продукт будет представлять из себя биомедицинский клеточный препарат (БМКП) для инъекций онкобольным. По своей сути препаратом будут являться генетически модифицированные T-лимфоциты здоровых доноров. Генная модификация будет заключаться в стабильных изменениях позволяющих препарату (лимфоцитам) вызывать эрадикацию опухоли, а также быть безопасным для пациента и универсальным для пациента любого пола, возраста, любой иммунносовместимости.

Продукт будет модифицирован сразу по нескольким направлениям (пять в одном или шесть в одном):

1. Модификация обеспечивающая специфичный цитотоксический эффект – это собственно CAR (химерный антигенный рецептор)
2. Модификация обеспечивающая усиление цитотоксического эффекта без нежелательных побочных эффектов
3. Модификация позволяющая «уходить» препарату от иммунной системы онкобольного, обеспечивающая длительный терапевтический эффект (усилитель персистенции)
4. Модификация позволяющая препарату не исчерпывать свой терапевтический ресурс из-за свойственного зрелым клеткам старения, обеспечивающая длительный терапевтический эффект (усилитель персистенции).
5. Модификация позволяющая препарату не оказывать побочных эффектов
6. Возможная дополнительная модификация позволяющая элиминировать препарат из кровотока.

### **Ожидаемые результаты проекта**

Будет получено 10 экспериментальных доз аллогенного CAR-T продукта.

### **Назначение и предполагаемое использование (внедрение) результатов проекта**

Внедрение результатов исследования в клиническую практику для терапии лимфопролиферативных заболеваний.

### **Описание предлагаемого научного исследования**

Для того чтобы получить аллогенный продукт необходимо соблюдать два условия: безопасность (достигается путем элиминации эндогенного T-клеточного рецептора,

а также наличием суицидальной кассеты) и эффективность (достигается «невидимостью» аллогенных CAR-T для иммунной системы реципиента – манипуляции с HLA). Аллогенные CAR-T можно получить направленным генным редактированием CRISPR/Cas9 системами, но технология CRISPR/Cas9 мало использовалась в клинических испытаниях, поэтому эффективность и безопасность данного подхода на пациентах до сих пор уверенно не доказана. Наш подход получения аллогенных CAR-T не предполагает генетических модификаций, а использует белки-ингибиторы и (или) shRNA TCR и HLA находящиеся в одной экспрессионной кассете с CAR.

Работа будет выполняться на базе Института Гематологии ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова», с использованием передовой инфраструктуры ОИ ЦДТИ ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

2019 год выполнения проекта:

1. Разработать технологию *ex vivo* ингибирования T клеточного рецептора (ТКР) и МНС в T-лимфоцитах человека
  - 1.1. Создать генетические конструкции, кодирующие инструменты ингибирования ТКР и МНС, и векторы доставки целевых конструкций в T-клетки человека
  - 1.2. Получить целевые и хэлперные плазмиды для наработки лентивирусных векторов для доставки инструменты ингибирования ТКР и МНС
  - 1.3. Нарботать препарат целевых лентивирусных векторов, обеспечивающих эффективность доставки целевых конструкций в T-лимфоциты человека (не менее 50% содержащих трансген клеток в популяции)
  - 1.4. Экспериментально подтвердить отсутствие экспрессии ТКР и МНС в T-лимфоцитах человека после *ex vivo* трансдукции лентивирусными векторами (в течение не менее 14 дней с момента трансдукции)

2020 год выполнения проекта:

2. Получить генетически модифицированные T-лимфоциты, одновременно экспрессирующие CAR рецептор и инструменты ингибирования ТКР и МНС, и протестировать их свойства *in vitro*
  - 2.1. Нарботать препарат целевых лентивирусных векторов в объеме, необходимом для оценки функциональной активности *in vitro* и противоопухолевой активности *in vivo*
  - 2.2. Отработать метод получения жизнеспособных CAR-T клеток путем лентивирусной трансдукции T-лимфоцитов условно здоровых доноров, обеспечивающий экспрессию целевой генетической конструкции (не менее чем в 50% CD3+ клеток в популяции)
  - 2.3. Экспериментально подтвердить в *in vitro* тестах избирательную цитотоксическую активность CAR-T по отношению к клеткам мишеням экспрессирующим CD19 (перевиваемые опухолевые линии и бласты полученные у пациентов)

Исследуемая группа (здоровые доноры для получения аллогенного препарата) – доноры без критериев исключения. Период наблюдения ограничен временем жизни T-лимфоцитов *in vitro* и *in vivo* на мышинных моделях.

2021 год выполнения проекта:

3. Оценить эффективность аллогенных CAR-T лимфоцитов *in vivo*
  - 3.1. Получить релевантные модели на основе трансгенных иммуносупрессивных мышей и разработать схему введения аллогенных CAR-T животным (B-ALL, CLL, DLBCL, PDX модели)
  - 3.2. Экспериментально подтвердить противоопухолевую активность аллогенных CAR-T в животной модели (снижение опухолевой массы по отношению к контрольным животным, персистенцию CAR-позитивных клеток в периферической крови)

животных не менее 21 дня с момента введения, экспрессию CAR- рецептора на поверхности клеток).

4. Создать схему получения, криоконсервации и разморозки аллогенных CAR-T лимфоцитов в объемах необходимых для проведения клинических исследований
- 4.1. Отработать метод криоконсервации и выведения из заморозки аллогенных CAR-T лимфоцитов, обеспечивающий сохранение жизнеспособности (не менее 80% клеток в популяции, без потери функциональной активности)
- 4.2. Разработать клинический протокол и отработать проведение процедуры получения мононуклеаров условно здоровых доноров методом афереза (аферезный материал должен содержать не менее 60% CD3+ клеток с жизнеспособностью не менее 90%)
- 4.3. Нарботать лентивирусные векторы в количестве, достаточном для получения терапевтической дозы аллогенных CAR-T
- 4.4. Провести трансдукцию Т-лимфоцитов полученных из аферезного материала условно здоровых доноров в масштабе, достаточном для моделирования биопроцесса получения алогенных CAR-T для введения человеку (1\*10<sup>10</sup> Т-лимфоцитов с содержанием CAR+ ТКР- клеток не менее 50%)
- 4.5. Экспериментально подтвердить возможность криоконсервации и длительного (до 6 месяцев) хранения терапевтических доз аллогенных CAR-T на период (с сохранением противоопухолевой активности *in vivo* и жизнеспособностью CAR-T после разморозки препарата не менее 90%)
- 4.6. Подготовить пакет документации, описывающей все этапы технологии производства генетических конструкций, лентивирусных векторов и аллогенных CAR-T клеток, а также протоколы забора биоматериала и криоконсервации / выведения из разморозки готового клеточного продукта..

**Описание научных подходов и методов, используемых для решения поставленных задач**

1. Метод полимеразной цепной реакции;
2. Стандартное кариотипирование;
3. Метод таргетного секвенирования (метод Сэнгера).