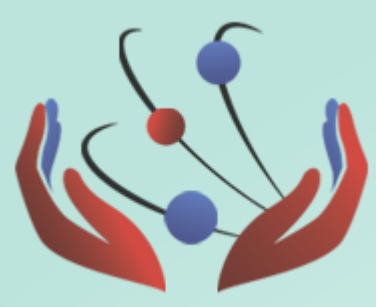
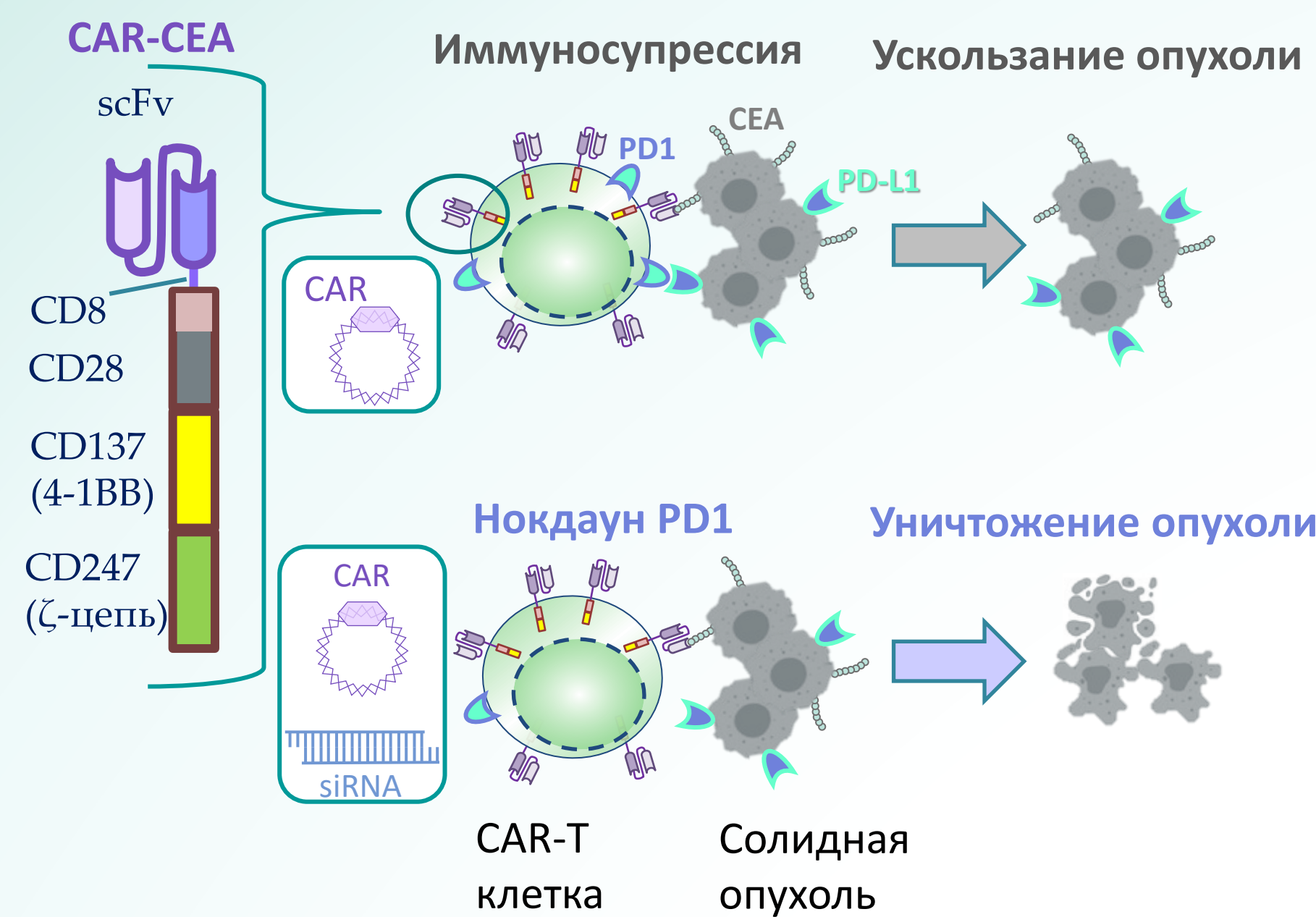




Разработка и проведение доклинических исследований CAR-T препарата на основе плазмидной конструкции, кодирующей рецептор к раково-эмбриональному антигену и анти-PD-1 shRNA

Киселева Я.Ю., Аминулла К.Г., Байрамов А.В., Шишкин А.М., Кулинич Т.М., Кудинова Е.А., Боженко В.К., Солодкий В.А.
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, г. Москва, Российская Федерация

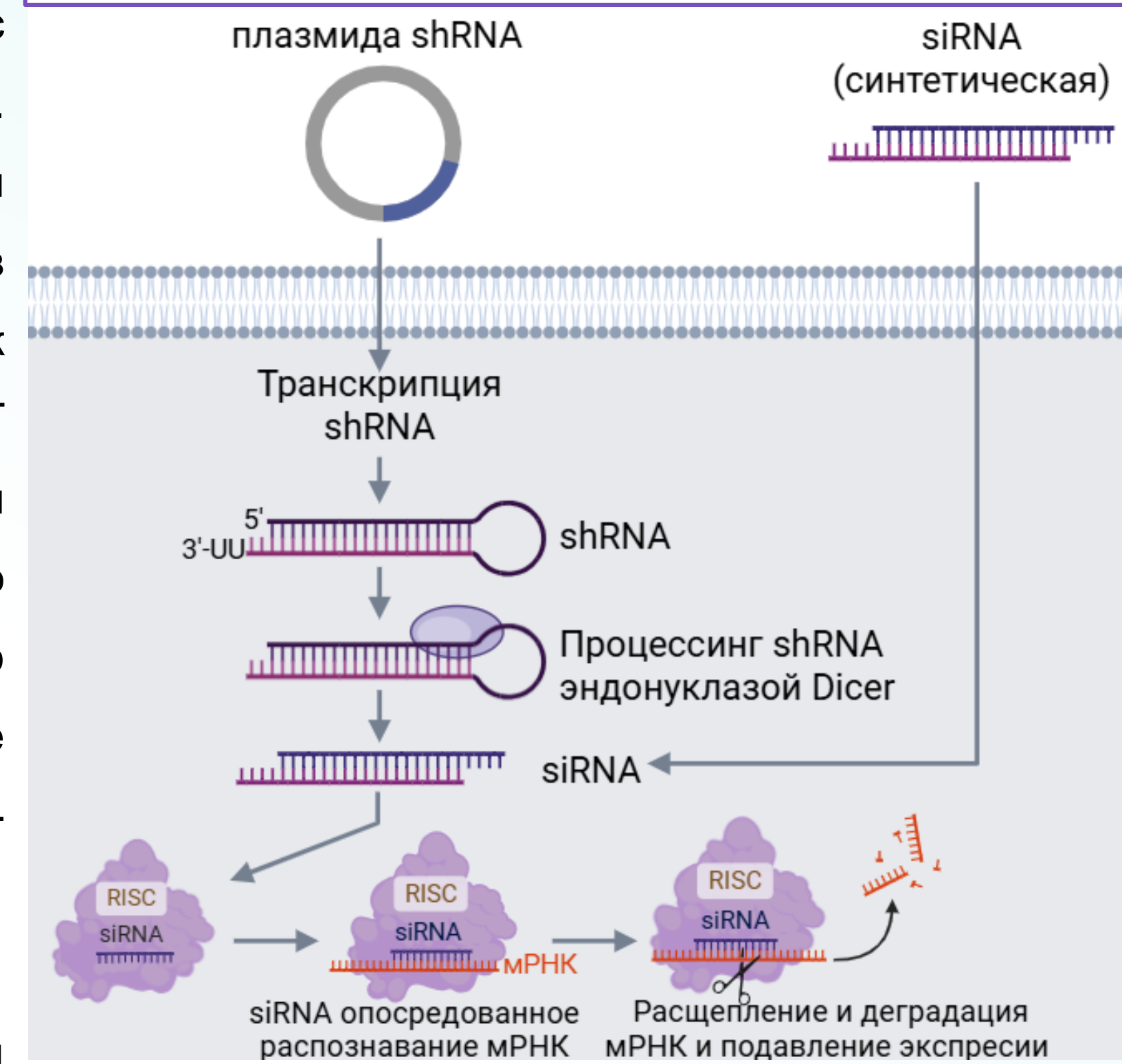
CAR-T терапия



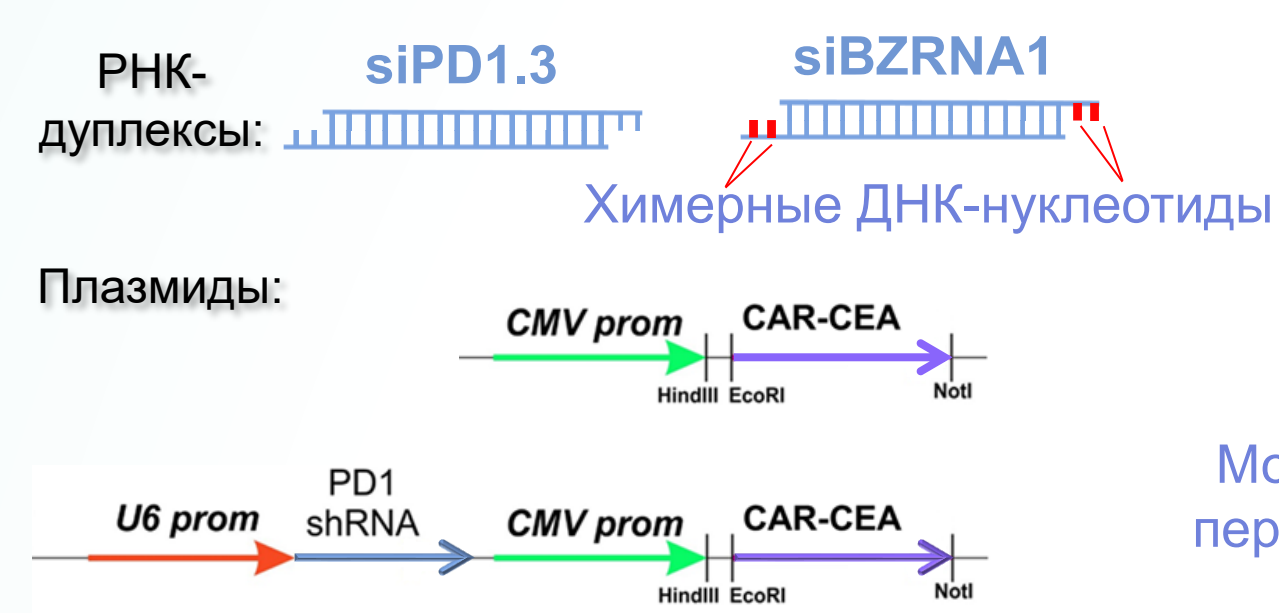
Введение. Адоптивная терапия солидных опухолей с использованием аутологических Т-лимфоцитов, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), сталкивается с рядом проблем, решение которых открывает перспективы повышения ее эффективности. Одной из проблем является локальная иммунная супрессия, возникающая в ткани опухоли и связанная преимущественно с экспрессией на поверхности лимфоцитов ингибирующих рецепторов, в частности, PD1. Наличие на поверхности опухолевых клеток лигандов PD1 (PD-L1) приводит к подавлению цитотоксических функций CAR-T лимфоцитов, способствуя выживанию опухоли. Привлекательным подходом для решения этой проблемы представляется получение опухоль-специфических CAR T-лимфоцитов со сниженной или нокаутированной экспрессией PD1. Это может быть сделано с помощью РНК-интерференции, путем трансфекции siRNA (small-interfering RNA, малые интерферирующие РНК) в Т-клетки одновременно с введением ДНК- или РНК-конструкции, кодирующей антиген-специфический рецептор

Цель исследования – получить CAR-T клетки, демонстрирующие пониженный уровень экспрессии ингибирующего рецептора PD1 и повышенный уровень экспрессии CAR, в том числе за счет оптимизации последовательности лидерного пептида.

РНК-интерференция

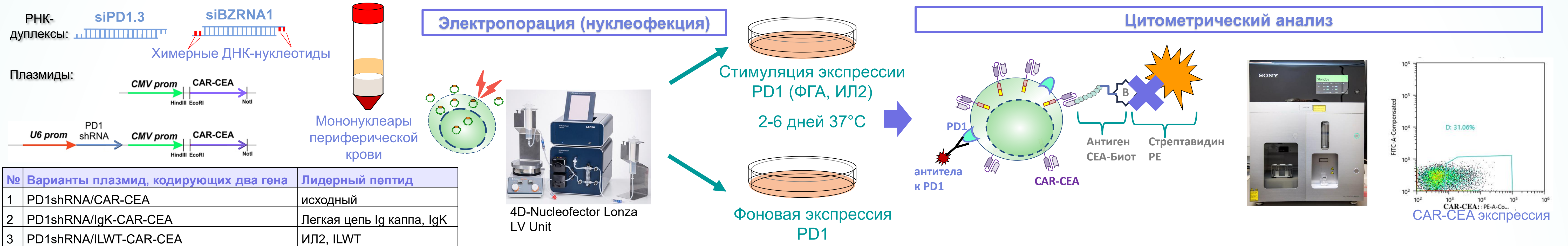


Материалы



№	Варианты плазмид, кодирующих два гена	Лидерный пептид
1	PD1shRNA/CAR-CEA	исходный
2	PD1shRNA/IgK-CAR-CEA	Легкая цепь Ig kappa, IgK
3	PD1shRNA/ILWT-CAR-CEA	ИЛ2, ILWT

Методы



Результаты

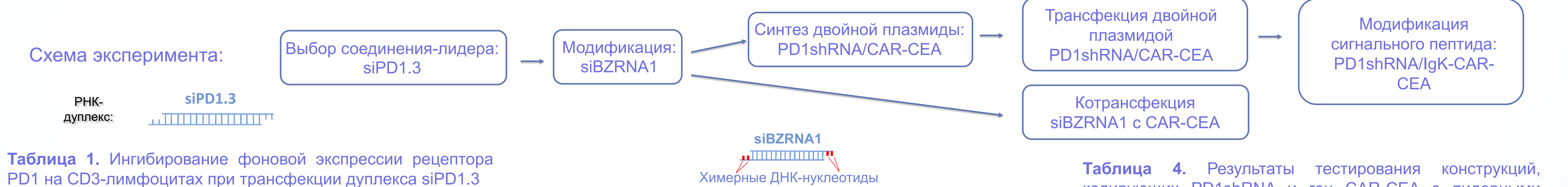


Таблица 1. Ингибирование фоновой экспрессии рецептора PD1 на CD3-лимфоцитах при трансфекции дуплекса siPD1.3

Условие	Жизнеспособность, %	PD1+ от числа CD3+, %	Ингибирование, %
День 1 после трансфекции			
r-siRNA*	88,5±0,3	12,4±0,6	
siPD1.3_60nM	89,1±0,1	7,0±0,2	46%
siPD1.3_180nM	88,4±0,4	4,3±0,4	69%
siPD1.3_300nM	88,2±0,6	4,0±0,3	70%
День 2 после трансфекции			
r-siRNA	86,6±0,3	9,9±1,0	
siPD1.3_60nM	89,0±0,2	5,5±0,4	44%
siPD1.3_180nM	88,7±0,3	3,9±0,1	61%
siPD1.3_300nM	89,3±0,1	3,2±0,1	69%
День 3 после трансфекции			
r-siRNA	85,0±0,6	9,0±0,7	
siPD1.3_60nM	86,8±0,4	4,0±0,2	55%
siPD1.3_180nM	85,2±0,4	2,3±0,1	74%
siPD1.3_300nM	85,9±0,5	1,9±0,1	79%

Примечание: *r-siRNA - дуплекс с рандомизированной последовательностью

✓ Эффект ингибирования проявляется уже через сутки после трансфекции дуплексов и остается довольно стабильным на протяжении 3 дней культивирования.

✓ Ингибирование является дозозависимым

✓ Все исследованные концентрации дуплекса, включая самую высокую – 300 нМ, не снижают жизнеспособность клеток на протяжении 3 дней культивирования.

Таблица 2. Влияние siBZRNA1 на экспрессию PD1 после одновременной трансфекции с плазмидой CAR-CEA и последующей стимуляции

Условия	Жизнеспособность, %	CAR+ от числа лимфоцитов в, %	PD1+ от числа лимфоцитов в, %	Ингибирование, %
Пульс-лимфоциты	62,5±3,8	-	62,3±5,2	-
r-siRNA	61,5±2,8	-	63,7±4,7	-
CAR-CEA	44,0±3,7	13,7±1,8	56,4±4,5	11%
CAR-CEA + siBZRNA1	45,5±3,5	13,2±1,0	4,0±1,1	94%

При котрансфекции гена CAR и дуплексов siRNA, модифицированных химерными ДНК нуклеотидами уровень экспрессии CAR-CEA не снижался, при этом ингибирование PD1 достигало 94%.

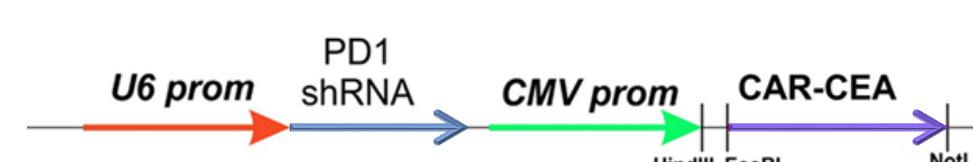


Таблица 3. Оценка влияния эффекта РНК-интерференции на уровень поверхностной экспрессии CAR-CEA

Условия	Жизнеспособность, %	CAR-CEA+ от числа лимфоцитов, %
CAR-CEA	66,1±6,1	15,1±1,2
PD1shRNA /CAR-CEA	56,4±9,7	12,6±2,4
CAR-CEA + siBZRNA	68,7±2,8	14,4±1,5

Между двумя способами получения CAR с пониженным уровнем экспрессии с PD1 нет достоверных различий в жизнеспособности и экспрессии CAR-CEA. В обоих случаях наблюдается невысокий уровень экспрессии CAR-CEA.

Таблица 4. Результаты тестирования конструкций, кодирующих PD1shRNA и ген CAR-CEA с лидерными пептидами IgK и ILWT

Условия	Жизнеспособность, %	CARCEA+ от числа лимфоцитов, %
пульс-лимфоциты	67,8±3,9	-
PD1shRNA /IgK-CAR-CEA	52,5±3,1	31,4±3,5
PD1shRNA /ILWT-CAR-CEA	55,4±4,3	14,8±3,8

✓ Использование в качестве сигнального пептида легкой цепи иммуноглобулина каппа (IgK) дает лучший статистически достоверный результат экспрессии CAR-CEA по сравнению с нативным лидерным пептидом и сигнальным пептидом ИЛ-2.

✓ Плазмиды PD1shRNA/IgK-CAR-CEA способна ингибировать как фоновую, так и индуцированную экспрессию PD1. Эксперименты показали, в обоих случаях экспрессия PD1 была подавлена на 67-70% (66,8±1,9% и 70,2±1,7%, соответственно) на второй и третий день после трансфекции.

Рис. 1 Стратегия гейтирования

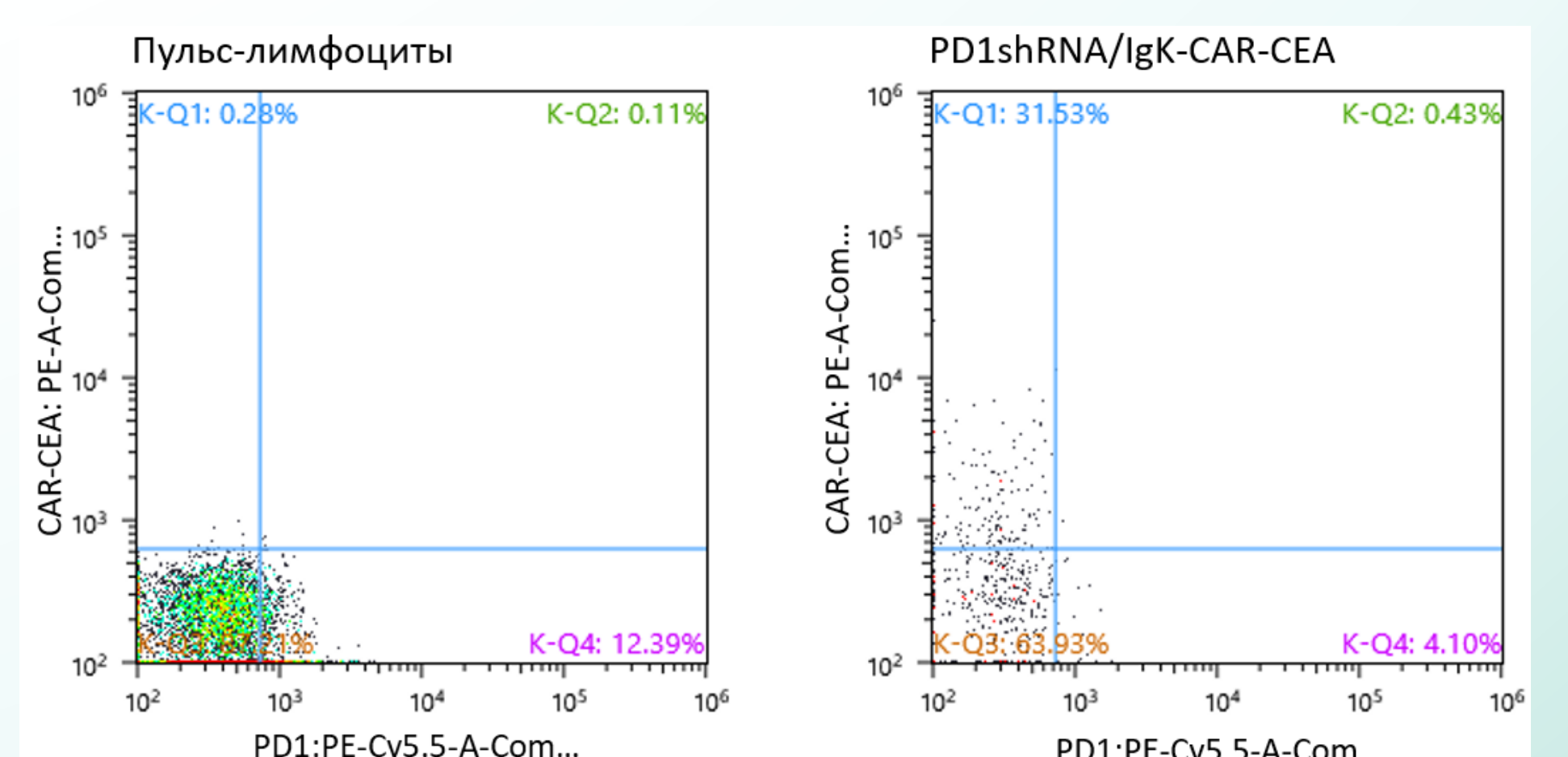
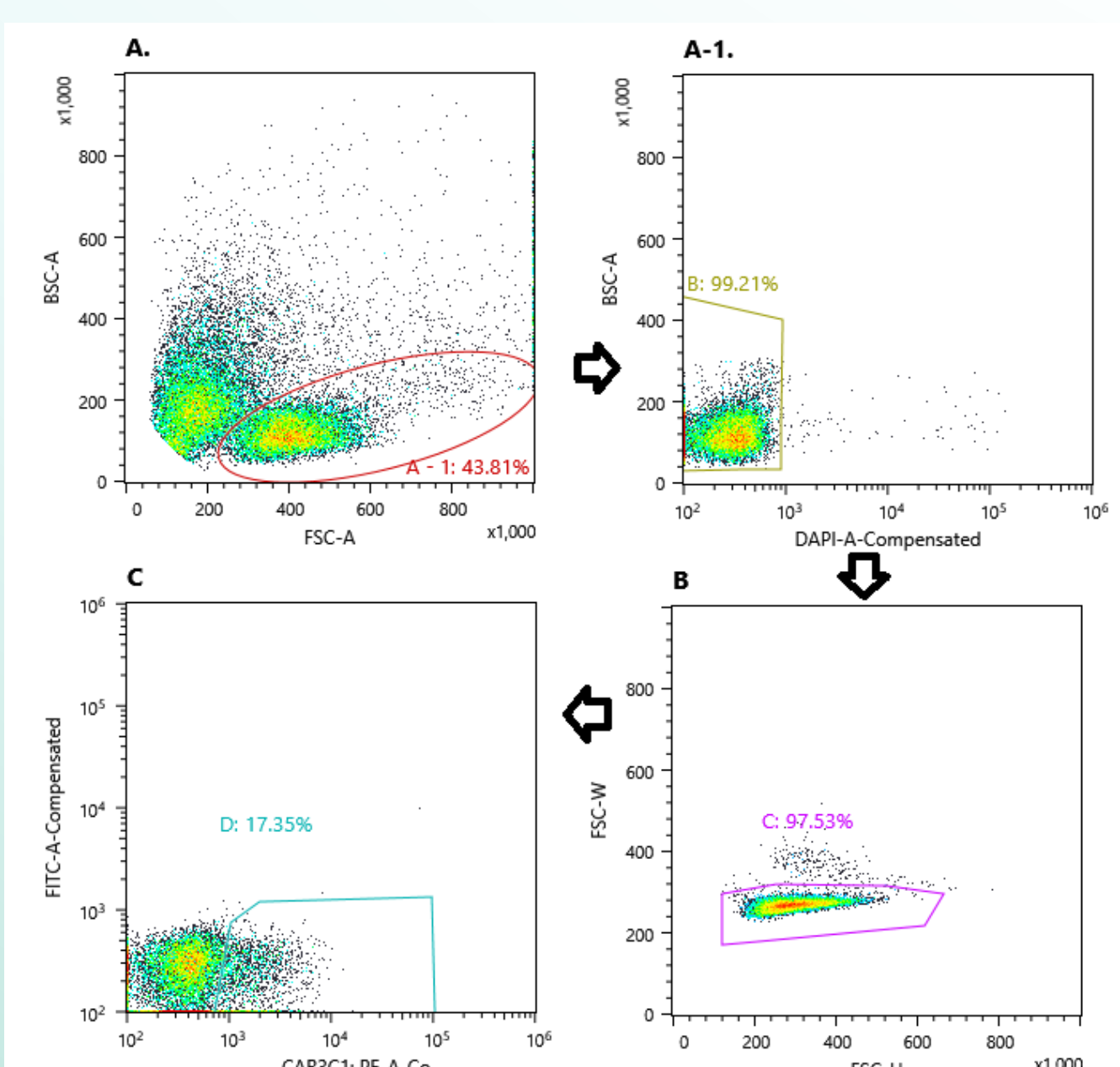


Рис. 2. Ингибирование экспрессии PD1 в лимфоцитах, несущих CAR-CEA. Взаимное распределение экспрессии CAR-CEA и PD1 при одновременном окрашивании.

Выводы: в результате проведенной оптимизации с использованием РНК-интерферирующих конструкций нам удалось получить CAR-T клетки со значительным подавлением экспрессии PD1 как при использовании плазмиды, кодирующей одновременно CAR и shRNA, так и при котрансфекции CAR-кодирующей плазмидой и модифицированными дуплексами siRNA. При этом эффект ингибирования во втором случае был выше. Также удалось повысить экспрессию CAR на поверхности клетки, заменив природный сигнальный пептид.

Контакты: Аминулла Камилла Гуламовна, e-mail: kamilla.ami@mail.ru. 117997, г. Москва, ул. Профсоюзная, д. 86, ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России