

## АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на соискание степени доктора философии (Ph.D.) по специальности 6D060700 – Биология

**МУХАТАЕВ ЖУСИПБЕК ЕРКИНОВИЧ**

### **Разработка подходов к стимуляции Т-регуляторных клеток для иммунотерапии витилиго**

**Общая характеристика работы.** Диссертационная работа посвящена изучению фенотипических характеристик Т-регуляторных клеток (Трег) периферической крови больных витилиго и разработке подходов к стимуляции и созданию антиген-специфичных Трег клеток, с помощью трансгенного химерного антигенного рецептора (CAR), для клеточной иммунотерапии витилиго, и влияние антибиотиков для контроля депигментации у мышах.

**Актуальность темы исследования.** Витилиго является неизлечимым, малоизученным аутоиммунным заболеванием кожи, поражающим 0,5-1% населения мира. Согласно официальной статистике РГП на ПХВ «Казахский научный центр дерматологии и инфекционных заболеваний» Министерства Здравоохранения Республики Казахстан, в 2018 году распространённость витилиго составила 9,6 случаев на сто тысяч населения. На сегодняшний день отсутствуют таргетные методы лечения витилиго из-за ограниченного финансирования исследований заболевания, так как витилиго не относится к категории смертельных или опасных для жизни болезней. Обычно назначаемая терапия включает кортикостероиды для наружного применения, UVB фототерапию, хирургическую трансплантацию меланоцитов и полную депигментацию, в случае, если у пациента более 70-80% поражений витилиго. Данные подходы лечения витилиго являются не эффективными и обладают серьёзными побочными эффектами, а трансплантация меланоцитов и полная депигментация относятся к экстремальным методам. С точки зрения качества жизни, витилиго негативно сказывается на качестве жизни и благополучие пациентов. Стигматизация варьирует в разных культурах, многие пациенты испытывают психологический стресс, низкую самооценку и депрессию, что может привести к попыткам самоубийства.

Этиология витилиго до конца не изучена. Считается, что в развитие витилиго участвует комплекс факторов, включая стресс, генетическую предрасположенность, факторы окружающей среды и меланоцит-специфичный аутоиммунный ответ. Согласно последним исследованиям, срыв иммунной толерантности считается основной причиной развития заболевания, при котором цитотоксические Т-клетки атакуют меланоциты пациента. Большинство аутоиммунных заболеваний имеют сходную этиологию, связанную с нарушением

регуляции иммунного ответа, в том числе с дефицитом или нарушением активности Треггов. При проблеме распознавании собственных или чужих антигенов иммунная система неспецифично разрушает клетки и ткани организма и в результате вызывает аутоиммунные заболевания. Роль Треггов в этом случае заключается в активном подавлении активации иммунной системы и предотвращении патологической само-реактивности. При витилиго наблюдается системное снижение доли CD39<sup>+</sup> и CD44<sup>+</sup> Треггов, которое определяет фенотипические характеристики и функциональную активность, а также уменьшение миграции Треггов в очаги витилиго, что коррелирует с площадью депигментации. Также ранее было показано, что адаптивный перенос Треггов мышам с витилиго, приводил к временной остановке депигментации. Таким образом, было выдвинуто предположение, что использование антиген-специфичных Треггов в качестве клеточной иммунотерапии витилиго может обладать высокой эффективностью, восстанавливая локальную иммунную толерантность и предотвращая нежелательные аутоиммунные реакции.

Для восстановления иммуносупрессорной активности Треггов и повышения их хоуминга в область аутоиммунного воспаления было предложено получение Треггов с химерным антигенным рецептором (CAR), специфичного к антигенам клеток, подвергающихся аутоиммунной атаке. В настоящее время терапия на основе CAR-несущих Т-клеток широко используется для лечения различных типов рака. Данные подходы основываются на введении пациентам аутологичных CAR-модифицированных Т-клеток, которые распознают конкретные антигены раковых клеток. Некоторые CAR-Т-клеточные методы терапии рака показали высокую эффективность лечения пациентов по сравнению с традиционными методами лечения и были одобрены к использованию в клинике. Было выдвинуто предположение, что данный подход, с использованием Треггов, может быть также использован для лечения аутоиммунных заболеваний. Таким образом, мы разработали метод получения CAR Треггов, специфичных к антигену ганглиозид Д3 (GD3), экспрессируемому меланоцитами, и исследовали эффективность их применения для повышения их миграции в очаги витилиго и обеспечения локальной иммунной толерантности к меланоцитам.

Также перспективным направлением терапии витилиго и других аутоиммунных заболеваний считается коррекция микробиома, в результате применения антибиотиков. Важность микробиома в настоящее время привлекает все большее внимание исследователей в связи с его влиянием на развитие болезней. Ранее сообщалось, что системное и локальное влияние антибиотиков на микробное разнообразие влияет на прогрессирование заболеваний при некоторых заболеваниях, включая угри, псориаз и атопический дерматит. В то время как микробное разнообразие поддерживает иммунный гомеостаз, некоторые виды бактерии могут вызывать патогенные реакции путем продуцирования Робо-продуцирующих комменсальных бактерий при волчанке. Другие примеры включают увеличение количества *B. adolescentis*, коррелирующего с

аутоиммунным артритом человека. Некоторые микробные пептиды могут вызывать ответ CD8 T-клеток, однако эти ответы в последнее время недостаточно изучены. Таким образом, лучшее понимание бактерий, влияющих на активацию T-клеток, может выявить влияние микробиома на развитие витилиго. Таким образом, антибиотики были использованы на модели мышей, склонных к витилиго, для оценки изменения микробиома и распределения Трегов.

Таким образом, данное исследование, направленное на изучение фенотипических характеристик Трег клеток периферической крови больных витилиго и разработки метода получения ганглиозид D3 (GD3)-специфичных CAR-трансгенных Трег клеток (GD3-специфичных CAR-Трегов) и исследования его эффективности для лечения витилиго *in vitro* и *in vivo*, а также исследование влияния использования антибиотиков, изменяющих микробиом, на иммуносупрессорную активность Трег клеток при витилиго, обладает новизной и является актуальным как для разработки новых подходов иммунотерапии как витилиго, так и других тяжелых аутоиммунных заболеваний.

**Цель исследования.** Целью исследования является изучение фенотипических характеристик Трегов периферической крови больных витилиго и разработка подходов для стимуляции и генерации антиген-специфических Трегов на основе CAR в качестве потенциальной иммунотерапии витилиго и изучение эффективности подходов *in vitro* и *in vivo*, а также влияние антибиотиков для контроля депигментации у мышах.

Основными задачами исследования для достижения цели являются следующие:

1. Изучить фенотипические характеристики Трегов периферической крови больных витилиго.
2. Разработать подходы для поддержания иммуносупрессивного фенотипа Трегов *in vitro*.
3. Разработать метод получения антиген-специфичных Трегов для клеточной иммунотерапии при витилиго.
4. Изучить иммуносупрессорную активность GD3-специфичных CAR-Трегов *in vitro*.
5. Изучить эффективность GD3-специфичных CAR-Трегов *in vivo* в экспериментальной модели витилиго.
6. Изучить влияние антибиотиков на микробное разнообразие для контроля депигментации при витилиго.

**Объекты исследования и материалы.** T-регуляторные клетки периферической крови больных витилиго, CD3<sup>+</sup> T-клетки и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Треги мышей, человеческие HLA-A2-позитивные и -негативные меланоциты, TCR-трансгенные мыши (h3TA2).

**Методы исследования.** Культивирование клеток, трансфекция, вирусная трансдукция, проточная цитометрия, иммуногистохимия, иммунофлуоресцентное окрашивание, флуоресцентная микроскопия, иммуноферментный анализ,

флуоресцентная визуализация живых клеток, анализ апоптоза, опосредованный каспазой-3/7, перенос адаптивных клеток, сканирование мышей, анализ изображений в графическом редакторе Adobe Photoshop, статистический анализ с использованием программ GraphPad Prism и R.

**Научная новизна исследования.** В ходе исследования впервые было обнаружено, что доля CD39<sup>+</sup> и CD44<sup>+</sup> Трегов периферической крови значительно снижена при витилиго. Также было установлено, что у больных витилиго, находящихся на стадии ремиссии, также снижена доля Трегов с фенотипом CD39<sup>+</sup> и CD44<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> по сравнению с контролем. Полученные данные указывают на дисфункцию Трег-клеток при витилиго и могут свидетельствовать о снижении их иммуносупрессорных свойств и способности эффективно мигрировать в очаги депигментации, что может приводить к неконтролируемой активности меланоцит-специфичных Т-клеток и прогрессии заболевания. Полученные результаты вносят вклад в понимание механизмов нарушения иммунной регуляции при витилиго и могут послужить основой для разработки новых подходов к лечению витилиго на основе повышения супрессорной активности Трегов и их рекрутирования в пораженные витилиго участки кожи.

Впервые была выявлена сверхэкспрессия GD3 в пораженных эпителиальных клетках и меланоцитах, в пораженных витилиго участках кожи людей и мышей. Повышенная экспрессия поверхностного антигена GD3, была идентифицирована как антигенная мишень при витилиго.

В диссертации описывается метод получения антиген-специфичных Трегов, несущих CAR к антигену, экспрессирующих в эпителиальных клетках и меланоцитах, и исследована эффективность применения GD3-специфичных CAR-Трегов для восстановления иммунной толерантности *in vitro* и *in vivo*. В частности, разработан метод трансдукции, который обеспечивает получение Трегов с высокой экспрессией CAR, специфичного к GD3. Также, был разработан и оптимизирован новый подход для поляризации наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Трегов и расширения пула Трегов *in vitro* при сохранении их фенотипа. Впервые была использована GD3 кодированная конструкция CAR для получения высоко трансдуцированных антиген-специфичных Трегов *in vitro* с использованием оптимизированного протокола трансдукции с использованием ретровирусов. Исследования в условиях *in vitro* показали, что полученные GD3-специфичных CAR-Треги обладают антигенной специфичностью и высоким уровнем продукции иммуносупрессорного цитокина IL-10. Также, анализ жизнеспособности меланоцитов *in vitro* был проведен впервые с использованием новой системы визуализации живых клеток для оценки иммуносупрессорной активности GD3-специфичных CAR Трегов. При этом, внесение GD3-специфичных CAR Трегов в ко-культуру меланоцитов человека и меланоцит-реактивных цитотоксических Т-клеток приводило к повышению уровня жизнеспособных меланоцитов. Также было выявлено, что GD3-специфичные CAR Треги обладают большей иммуносупрессорной активностью в отношении

меланоцит-реактивных цитотоксических Т-клеток по сравнению с поликлональными Трегами человека.

При изучении эффективности использования GD3-специфичных CAR-Трегов *in vivo* было обнаружено, что при адаптивный перенос полученных Трегов трансгенным мышам с витилиго, обеспечивает более эффективное восстановление иммунной толерантности в очагах поражения и контроля площади депигментации. В сравнении с поликлональными Трегами, GD3-специфичные CAR Треги обладают лучшей способностью хоуминга к эпителиальным клеткам и меланоцитам с большей иммуносупрессорной активностью в отношении пролиферации меланоцит-специфических цитотоксических Т-клеток.

Впервые было исследовано микробное разнообразие после введения антибиотиков таких как ампициллин и неомицин, и его влияние на развитие витилиго в экспериментальной мышинной модели. Было обнаружено, что ампициллин приводит к усилению депигментации, тогда как неомицин подавляет развитие заболевания путем опосредованного влияния на инфильтрацию Трегов кожи.

Полученные данные раскрывают механизмы развития витилиго и могут быть использованы для создания подходов клеточной иммунотерапии витилиго, на основе применения антиген-специфических Трегов.

#### **Теоретическая и практическая значимость исследования.**

Диссертационная работа вносит вклад в фундаментальную иммунологию в аутоиммунных заболеваниях. Изучение фенотипических характеристик Трегов позволяет понять роль различных популяции Трегов, которые опосредуют различные аутоиммунные расстройства. Изучение иммуносупрессивной способности GD3-специфичных CAR Трегов освещает область действия *Bystander* эффект Трегов *in vivo* и помогает приблизиться на один шаг, чтобы выявить полный механизм нарушения иммуносупрессии при аутоиммунных заболеваниях.

Практическая значимость полученных результатов заключается в разработке новых подходов терапии аутоиммунных заболеваний с помощью применения трансгенных Трегов на основе CAR, обладающих антиген-специфичностью. Полученные данные позволяют предположить, что GD3-специфичные CAR-Треги могут эффективно распознавать антиген и обеспечивать локальную иммунную толерантность к меланоцитам *in vivo*. Полученные в ходе выполнения диссертационной работы данные свидетельствуют об эффективности адаптивного переноса CAR-модифицированных Трегов для лечения витилиго, что говорит о перспективах данного метода для дальнейших клинических испытаний. Более того, полученные данные и разработанные методы могут послужить основанием для разработки иммунотерапии других аутоиммунных заболеваний, таких как *pemphigus vulgaris*, *pemphigus bullous*, псориаз, рассеянный склероз, целиакия, болезнь Крона, волчанка и др.

Также, практическая значимость полученных результатов заключается в выявлении опосредованного влияния неомицина на повышение инфильтрации

участков кожи Трегами и снижение депигментации в экспериментальной модели витилиго. Полученные данные также могут использоваться для разработки подходов терапии витилиго.

В ходе исследования также был подготовлен и оптимизирован детальный протокол трансдукции, который обеспечивает получение Трегов с высокой экспрессией антиген-специфичного CAR. Были разработаны протоколы экспериментов для изучения уровня иммуносупрессии *in vitro* с использованием меланоцитов человека, экспрессирующих GD3, в качестве клеток-мишеней, цитотоксических Т-клеток, специфичных к h3T, в качестве эффекторных клеток, а также GD3-специфичных CAR-Трегов или поликлональных Трегов, экспрессирующих eGFP связанным с FoxP3, в качестве клеток-супрессоров. Также, для анализа уровня жизнеспособности меланоцитов был оптимизирован подход с использованием новой системы визуализации живых клеток IncuCyte, который позволяет получать несколько снимков с течением времени и с использованием реагента caspase-3/7 Red, детектирующего клетки, подвергающиеся апоптозу, опосредованному caspase-3/7. Разработанные экспериментальные методы могут быть использованы в исследованиях в области молекулярной и клеточной иммунологии.

Таким образом, диссертационная работа обладает теоретической и практической значимостью.

#### **Основные положения к защите:**

1. Доля CD39<sup>+</sup> и CD44<sup>+</sup> Трегов периферической крови значительно снижена при витилиго.
2. Экспрессия ганглиозида D3 повышена человеческими и мышинными эпителиальными клетками и меланоцитами при витилиго.
3. Треги могут быть трансдуцированы с высокой эффективностью с помощью конструкции CAR, кодирующей GD3, посредством ретровирусной трансдукции.
4. Разработан протокол расширения пула Трегов, сохраняющих иммуносупрессорный фенотип *in vitro*.
5. GD3-специфичных CAR-Треги обладают высокой специфичностью к GD3-антигену и иммуносупрессорной активностью *in vitro*.
6. Адаптивный перенос GD3-специфичных CAR-Трегов трансгенным мышам h3TA2, страдающим витилиго подавляет депигментацию в очагах витилиго.
7. GD3-специфичные CAR-Треги эффективно распознают антиген на пораженных эпителиальных клетках и меланоцитах и обеспечивают локальную иммунную толерантность у мышей.
8. Неомицин вызывает повышение инфильтрации Трегов на образцах кожи путем опосредованного влияния на микробное разнообразие и способствует контролю депигментации при витилиго у мышей.

**Уровни организации исследований.** Исследования, описанные в этой диссертации, проводились на молекулярном, клеточном, тканевом, органном и организменном уровнях.

**Связь исследования с научным проектом.** Исследования по разработке подходов к иммунотерапии витилиго с использованием антиген-специфических Т-реггов были поддержаны грантом Национального института здравоохранения RO1 AR057643 доктору I. Caroline Le Poole. Большая часть исследований была проведена в лаборатории доктора Ле Пула, которая специализируется на иммунологии и дерматологии. Это исследование также было поддержано инициативой доктора Ле Пула, которая предоставила стипендию, и консультировала это исследование в течение всей Ph.D. докторантуры. В Казахстане местный научный руководитель Остапчук Екатерина. О. консультировала и поддержала это исследование с начала первого года обучения и предоставление рекомендаций и советов во время исследований. Исследование фенотипических характеристик Т-реггов пациентов с витилиго было поддержано грантом AP05131691 «Молекулярные механизмы влияния Т-регуляторных клеток на активность опухолевых клеток», предоставленным Комитетом по науке Министерства образования и науки Республики Казахстан, Остапчуку Екатерине Олеговне, которая было выполнено в Институте молекулярной биологии и биохимии имени М.А.Айтожина.

**Личный вклад автора.** Все основные результаты, описанные здесь, выполнены и собраны автором. Кроме того, основные результаты исследований, анализы, таблицы, данные и рисунки созданы автором, а все новые наблюдения и выводы делаются на основе результатов, полученных от работы и исследования Ph.D. докторанта.

**Апробации исследования.** Основные результаты и наблюдения представлены и обсуждены на международных конференциях и симпозиумах:

- на Международном симпозиуме - Oral Presentation: Awardee of Society for Investigative Dermatology Eugene M. Farber Travel Awards for Young Investigators “The Joint Montagna Symposium on the Biology of Skin/Pan American Society for Pigment Cell Research Annual Meeting “Melanoma to Vitiligo: The Melanocyte in Biology and Medicine” (2018, Salishan Resort, Oregon);

-на международном научном саммите “2nd Antigen-Specific Immune Tolerance Drug Development Summit 2019” (2019, Boston, USA);

- на научной конференции “Northwestern Research Day 2019” (2019, Chicago, USA);

- на Международной научной конференции “Society for Investigative Dermatology (SID) Annual Meeting” (2019, Chicago, USA);

- на Международной научной конференции “The Society for Immunotherapy of Cancer (SITC), 34th Annual Meeting & Pre-Conference Programs, Nov. 6–10, (National Harbor, 2019, Chicago, USA);

- на Международной научной конференции “Society for Investigative Dermatology (SID) Annual Meeting” (2019, Chicago, USA);

- на Международной научной конференции для студентов и молодых ученых «Фараби элеми» (2018, Алматы, Казахстан);

- на Международной научной конференции молодых ученых «Фундаментальные исследования и инновации в молекулярной биологии, биотехнологии, биохимии» к 80-летию со дня рождения академика Мурата Абеновича Айтхожина 28-29 ноября (2019, Алматы, Казахстан).

**Публикации.** Большая часть содержания диссертации была опубликована в 13 научных работах, в том числе 1 исследовательская статья с импакт-фактором (IF) = 6,29 и 3 тезисов, опубликованных в журналах с импакт-фактором (IF = 8,728; IF = 6,29; IF = 4,172) в соответствии с База данных *SCOPUS*, 4 статьи в научных журналах, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (ККСОН МОН РК), и 5 тезисов докладов в материалах международных конференций, симпозиумов и саммитов. Провизиональный патент США (серийный № 62/915,945 в США) был получен 16.10.2019 под названием «Материалы и методы лечения витилиго», и последовательно патент США и международный патент PCT (Utility&PCT, серийный №:17/072,939&PCT/US2020 / 056104) было подано 16.10.2020 под названием «МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИТИЛИГО» (внутренняя ссылка: NU2019-172-02 и -03).

**Структура диссертации.** Эта диссертация написана на 122 страницах и содержит обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждения, выводы, ссылки из 215 источников, где 207 на английском языке; содержит 3 таблиц, и 50 рисунков.