

Информация о выполнении проекта по Соглашению № 14.604.21.0169 от 26.09.2017 за 2-й этап работ

Наименование организации Исполнителя:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН).

1. Основные результаты проекта (2-ой этап)

При выполнении работ второго этапа были получены следующие результаты:

1 Проведено сравнение цитотоксической активности кондиционированных сред, содержащих лактаптин, кодируемый лентивирусными плазмидами, в сравнении с рекомбинантным лактаптином из *E. coli*. Показано, что кондиционированная среда от клеток НЕК293Т, трансфицированных плазмидой pEL1, содержащая целевой белок EL1, оказывала большее цитотоксическое действие на опухолевые клетки человека, чем аналог лактаптина RL2, продуцируемый клетками *E. coli*. Цитотоксическое действие среды с EL1 на опухолевые клетки происходит по типу апоптоза, с активацией эффекторных каспаз -3 и -7.

2 Проведено выделение лактаптина (EL1) из культуральных сред клеток-продуцентов. Показано, что электрофоретическая чистота очищенного белка EL1 составляет 75%. Цитотоксическая активность очищенного белка EL1 (IC50) в отношении клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 составляет 0.4 мкг/мл.

3 Разработана методика получения рекомбинантного лактаптина в эукариотических клетках НЕК293Т. Получен препарат лентивирусных частиц, кодирующих интеграционную кассету кДНК лактаптина. Титр полученного препарата $3,06 \cdot 10^6$ (при титровании на клетках НЕК293Т).

4 Проведена наработка клеток CAR-YT-Lact для проведения цитотоксических тестов и характеристики линии. Показано, что экспрессия лактаптина и химерного антигенного рецептора при культивировании на протяжении более чем 20 пассажей сохраняется.

5 Клеточные линии CAR-YT и CAR-YT-Lact депонированы в Коллекции плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления ИЦиГ СО РАН под номерами HSCC00068 и HSCC00069, соответственно.

6 Проведено изучение цитотоксической активности клеток линии CAR-YT-Lact в отношении опухолевых мишеней PC3 *in vitro*. Цитотоксическая активность клеток CAR-YT-Lact охарактеризована в отношении PSMA-позитивных и PSMA-негативных раковых мишеней. Показано, что цитотоксичность CAR-YT-Lact клеток связана как с эффектом от химерного антигенного рецептора, так и с действием лактаптина.

7 Разработан план исследований специфической (противоопухолевой и антиметастатической) активности и острой токсичности экспериментальных образцов CYTO-CAR-YT-Lact клеток.

8 За счет средств индустриального партнера проекта ООО «Биосан» проведены следующие работы:

- разработана методика получения лентивирусных частиц, кодирующих CRISPR/Cas9-делеционную библиотеку GeCKO. Функциональность библиотеки проверена при помощи подсчета клеток, нокаутных по гену поверхностного белка CD47.

- разработана методика получения CAR-YT-Lact клеток, экспрессирующих одновременно два белка противоопухолевой направленности. Первый – химерный антигенный рецептор – обеспечивает перенаправление цитотоксической активности самих НК-клеток YT в отношении раковых мишеней, позитивных по маркеру рака простаты PSMA. Вторым экспрессируемым белком - лактаптин, новый противораковый агент широкого спектра действия.

- проведено материально-техническое обеспечение работ по разработке методик получения лентивирусных частиц и CAR-YT-Lact клеток.

При выполнении работ этапа 2 проведены дополнительные патентные исследования, объектами которых являлись: таргетные противоопухолевые НК-клеточные продукты, более конкретно, терапевтические линии НК-клеток, секретирующие противоопухолевые белки, обладающие повышенной CAR-зависимой цитотоксической активностью, для терапии рака простаты. Объектами поиска являлись: геномное редактирование НК-клеточных линий, терапевтические линии CAR-NK или CAR-ΥT клеток, противоопухолевые НК-клеточные белки и способы лечения рака простаты с их использованием.

2. Назначение и область применения результатов проекта

Полученные результаты проекта могут быть использованы как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях и разработках, связанных с биотехнологией и биофармацевтикой. Практическое внедрение полученных результатов, создание на их основе противоопухолевых субстанций и лекарственных препаратов обеспечит востребованность результатов проекта практическим здравоохранением.

Исследования и разработки в области создания новых противоопухолевых лекарственных средств, обладающих направленным воздействием на опухолевые клетки и не оказывающих токсического действия на здоровые клетки организма являются приоритетными во всем мире. Таким образом, результаты проекта будут востребованы международным научным сообществом, в том числе при представлении на международных конференциях, и могут являться основой для международных фундаментальных исследований и прикладных проектов.

Полученные результаты полностью соответствуют требованиям Соглашения и Технического задания.