

Государственное
бюджетное учреждение
здравоохранения «Санкт-
Петербургский клинический
научно-практический центр
специализированных видов
медицинской помощи

(онкологический)»
(Санкт-Петербург, Россия)

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ ИММУННЫХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ В ОНКОЛОГИИ

А.А. Богданов, В.В. Высочинская, А.А. Корнев, А.К. Емельянов,
Ан. А. Богданов, В.М. Моисеенко

PROSPECTS FOR THE USE OF SMALL INTERFERING RNAS AS INHIBITORS OF IMMUNE CHECKPOINTS FOR IMMUNOTHERAPY IN ONCOLOGY

А.А. Богданов

К.ф.-м.н., заместитель директора
по научной работе ГБУЗ
«Санкт-Петербургский клинический
научно-практический центр
специализированных видов медицинской
помощи (онкологический)».
197758, Санкт-Петербург, п. Песочный,
ул. Ленинградская, 68 А, Лит. А.
ORCID: 0000-0002-7887-4635.

A.A. Bogdanov

PhD, Deputy director for science,
Saint Petersburg Clinical Research
and Practical Centre for Specialized Types
of Medical Care
(Oncological).
197758, Saint Petersburg,
Pesochny, Leningradskaya str.,
68A, Lit. A.
ORCID: 0000-0002-7887-4635.

В.В. Высочинская

Младший научный сотрудник.

V.V. Vysochinskaya
Junior researcher.

А.А. Корнев

Младший научный сотрудник.

A.A. Kornev
Junior researcher.

А.К. Емельянов

Старший научный сотрудник.

A.K. Emelyanov
Senior researcher.

Ан.А. Богданов

Младший научный сотрудник

An.A. Bogdanov
Junior researcher.

В.М. Моисеенко

Доктор медицинских наук, профессор,
директор Санкт-Петербургского
клинического научно-практического
центра специализированных видов
медицинской помощи (онкологический).
ORCID: 0000-0003-4807-7915.

V.M. Moiseyenko
Doctor of Medical Science, Professor,
Head of Saint-Petersburg clinical scientific
and practical center for specialised types
of medical care
(oncological).
ORCID: 0000-0003-4807-7915.

Иммунная терапия является одним из наиболее перспективных направлений в лечении онкологических заболеваний и направлена на повышение способности иммунной системы распознавать и элиминировать опухолевые клетки. Создание ингибиторов иммунных контрольных точек (ИКТ) на основе моноклональных антител, а также методов адоптивной клеточной терапии (АКТ) стало прорывом в иммунотерапии злокачественных новообразований, но несет в себе ряд серьезных ограничений в виде недостаточной эффективности, безопасности и рентабельности. Применение технологии РНК-интерференции открывает перспективы создания принципиально новых ингибиторов ИКТ и как следствие разработки более эффективных методов АКТ. В данном обзоре освещены основные проблемы и перспективы применения малых интерферирующих РНК (миРНК) в качестве ингибиторов ИКТ с целью оптимизации современных подходов АКТ.

Ключевые слова: иммунотерапия, адаптивная клеточная терапия, РНК-интерференция, таргетная терапия, ингибиторы иммунных контрольных точек.

Immune therapy is one of the most promising areas of cancer treatment. It is aimed at a cascade of processes responsible for the antitumor immune response. The involved regulatory mechanisms become targets for various therapeutic approaches aimed at restoring the impaired functions of immune cells that eliminate cancer cells. The ability of malignant cells to affect receptors of immune checkpoints is one of the most important mechanisms for suppressing antitumor immunity. The development of immune check-point inhibitors (ICIs) based on monoclonal antibodies, as well as the methods of adoptive cell therapy (ACT), are a breakthrough in the immunotherapy of malignant diseases, but it carries a number of limitations such as insufficient efficiency, safety and cost-effectiveness. The use of RNA interference technologies opens up prospects for the development of fundamentally new class of ICIs and, as a consequence, the development of more efficient ACT methods. This review presents the main problems and prospects of the use of small interfering RNA (siRNA) as the ICIs are highlighted in order to optimize modern AKT approaches.

Key words: immunotherapy, adoptive cell therapy, RNA interference, targeted therapy, immune checkpoint inhibitors.

Введение

В настоящее время онкологические заболевания занимают второе место в общей структуре смертности и представляют собой значимую медико-социальную проблему как в России, так и в большинстве стран мира. При этом обращает на себя внимание низкая эффективность стандартных подходов лечения при диссеминированных опухолях, включающих операцию, а также химио- и лучевую терапии. Все больше данных указывает на то, что определяющим течению и прогноз многих онкологических заболеваний является состояние и активность иммунной системы человека. В связи с этим все более перспективной стратегией лечения онкологических заболеваний на сегодняшний день становится применение иммунотерапевтических подходов, одним из которых является адоптивная клеточная терапия (АКТ). Данный вид терапии подразумевает введение пациентам аутологических активированных иммунных клеток, полученных *ex vivo*. На сегодняшний день существуют два основных направления АКТ: применение лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (ОИЛ), а также опухоль-специфичных цитотоксических генетически модифицированных лимфоцитов экспрессирующих гены химерных антигенных рецепторов (CAR) к специфическим опухолевым антигенам, называемых CAR T-клетками [1]. Однако несмотря на перспективность данного подхода, эффективность такой терапии считается невысокой [2]. Одной из причин низкой эффективности является иммуносупрессивное воздействие опухолевых клеток и их микроокружения на Т-лимфоциты, приводящие к их «истощению», состоянию в основном обусловленному устойчивой экспрессией ключевых белков иммунных контрольных точек (ИКТ) (белок запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1), цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4 CTLA4), блокирующих эффекторные функции данных клеток. Активное изучение таких иммуносупрессивных взаимодействий привело к разработке новых коммерческих препаратов на основе специфических антител в качестве ингибиторов ИКТ и внедрению их в клиническую практику либо в виде монотерапии различных видов злокачественных опухолей, либо в виде комбинированной терапии совместно с CAR-T клетками [3].

Отдельное место в области разработок новых методов клеточной иммунотерапии занимает применение синтетических малых интерферирующих РНК (миРНК) для нокдауна генов *PD-1* и *CTLA4* в Т-лимфоцитах с целью повышения их эффекторных функций при проведении АКТ [4]. Механизм действия миРНК заключается в запуске ими, после проникновения в клетку, фундаментального процесса РНК-интерференции (РНКи), в результате которого происходит деградация матричной РНК целевого гена. Такой подход, безусловно, обладает рядом преимуществ в сравнении с применением моноклональных антител, малых молекул, а также другими технологиями антисмысловой терапии. Однако, одним из ограничений подобного подхода является сложность доставки миРНК в Т-лимфоциты, обуславливая актуальность разработки эффективных и нетоксичных способов доставки миРНК в данный вид клеток. В настоящем обзоре будут рассмотрены механизм РНКи, основные наиболее эффективные на настоящий момент способы доставки миРНК в первичные активированные Т-лимфоциты в экспериментах *ex vivo*, а также отдельные случаи их потенциального применения на примере подавления экспрессии генов *PD-1* и *PD-L1* в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Иммунотерапия в онкологии. Контрольные точки иммунитета CTLA-4, PD-1 в качестве терапевтических мишеней

В основе иммунотерапии лежит восстановление противоопухолевого Т-клеточного иммунного ответа для элиминации клеток опухоли. Противоопухолевый иммунный ответ начинается с захвата антигенпрезентирующими клетками (АПК) опухолевых антигенов. После этого происходит этап распознавания Т-клеточными рецепторами (ТКР) Т-лимфоцитов опухоль-ассоциированных антигенов (ОАА), представленных на поверхности АПК совместно с молекулами главного комплекса гистосовместимости II класса (ГКГ, англ. МНС, major histocompatibility complex). Одновременно, для активации Т-лимфоцитов необходимы дополнительные костимулирующие и коинги-

бирующие сигналы, контролирующие выраженность и длительность иммунного ответа, а также иммунологическую толерантность. Так, помимо распознавания ОАА, для активации Т-лимфоцитов одновременно необходим второй костимулирующий сигнал в виде связывания рецептора CD28 на Т-клетке с CD80 или CD86 на поверхности АПК (рис. 1А) [5, 6]. Без костимуляции CD28 рецепторов на поверхности Т-клеток их активации не происходит, и они переходят в состояние анергии или апоптоза. Это один из основных механизмов периферической толерантности [6]. Этот этап противоопухолевого иммунного ответа происходит в лимфатическом узле.

На следующем этапе активированные эффекторно-цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) мигрируют в опухоль, клетки которой презентуют на своей поверхности антигены в комплексе с ГКГ I класса. При распознавании опухолевого антигена в комплексе с ГКГ I класса с помощью ТКР ЦТЛ выделяют гранзимы и перфорины и другие цитотоксические сигналы и обеспечивают лизис опухолевой клетки (рис. 1Б) [7].

Существуют строгие механизмы регуляции противоопухолевого иммунного ответа на всех этапах с целью предотвращения избыточной активации и появления аутореактивных клонов Т-клеток. Так, Т-клетки экспрессируют ко-ингибирующие молекулы CTLA4 и PD-1, действующие как негативные регуляторы активации для предотвращения развития избыточно сильного иммунного ответа. CTLA4, представляет собой мембранный рецептор, который связывает комплексы CD80 и CD86 на поверхности АПК. CTLA4 конкурирует с активирующим сигналом от CD28 и

подавляет каскад реакций от ТКР при презентации антигена Т-лимфоциту, ингибируя тем самым его активацию (рисунок 1А) [6, 8]. Также на поверхности уже активированных Т-лимфоцитов расположен рецептор PD-1, функция которого заключается в предотвращении активации сигнального каскада и снижении пролиферации, цитотоксичности и высвобождения из них различных цитокинов. PD-1 имеет лиганды программируемой клеточной гибели PD-L1 (programmed cell death ligand 1) и PD-L2 (programmed cell death ligand 2), которые могут находиться на поверхности как АПК, так и опухолевых клеток [8].

Данные регуляторные механизмы могут быть использованы опухолевыми клетками для ускользания от иммунного ответа. Клетки опухоли способны воздействовать на ИКТ (CTLA4, PD-1), подавляя функцию ЦТЛ, а также увеличивать экспрессию иммуносупрессивных молекул PD-L1, которые, связываясь с рецептором PD-1 на поверхности активированных Т-лимфоцитов, подавляют противоопухолевый иммунный ответ [9].

Современная иммунотерапия в онкологии представляет собой применение одного из трех подходов или их комбинацию: проведение АКТ, использование моноклональных антител – ингибиторов ИКТ (рис. 1), а также использование противоопухолевых вакцин. В то время как ингибиторы ИКТ на основе моноклональных антител позволяют повысить активность уже существующих в организме иммунокомпетентных клеток, противоопухолевые вакцины и АКТ представляют собой заместительную клеточную терапию, основанную на выделении из периферической крови

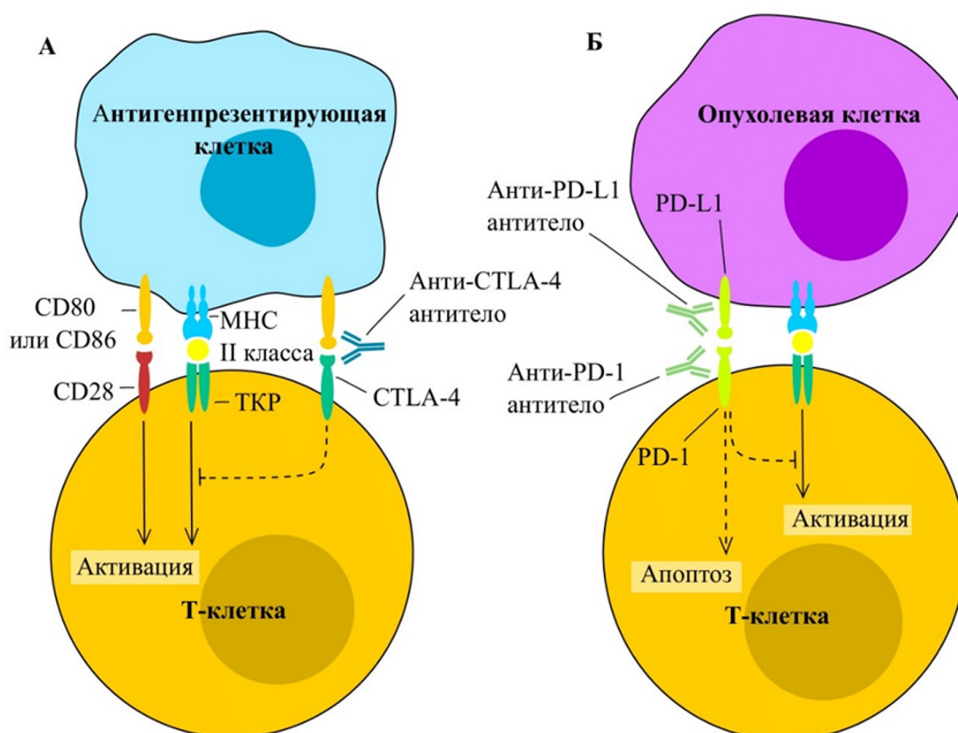


Рис. 1. Механизм функционирования иммунных контрольных точек и их ингибиторов

пациента клеток иммунной системы, их экспансии *ex vivo*, активации, а также генетической модификации с целью приобретения ими противоопухолевых свойств, и последующей реинфузии [1, 10].

АКТ стала прорывным направлением в лечении ряда онкологических заболеваний. На сегодняшний день существует два основных направления АКТ. Первое заключается в применении ОИЛ. Первые работы по их выделению и использованию в качестве инструмента адоптивной клеточной терапии были выполнены исследовательской группой Розенберга в Национальных институтах здравоохранения США в 80-х годах. Было показано, что выделенные из ткани опухоли экспериментальных животных лимфоциты, культивированные *in vitro* с лимфокинами и в последующем аутологично введенные им, приводили к уменьшению размеров опухоли [11]. Основная концепция эффективности такого метода заключается в устранении иммуносупрессивного воздействия опухолевого микроокружения на ЦТЛ [12]. К настоящему моменту эффективность данного подхода показана на разных видах злокачественных опухолей, включая рак шейки матки, почки, молочной железы, а также немелкоклеточный рак легких [1]. Значительный прогресс достигнут при лечении пациентов с метастатической меланомой, для которых противоопухолевый эффект такого вида терапии может достигать 50% [13]. При этом терапевтическая эффективность данного подхода ограничена иммуногенностью конкретной злокачественной опухоли [14].

В дальнейшем с развитием молекулярно-генетических методов появилось следующее более перспективное направление АКТ - терапия опухолевоспецифичными цитотоксическими генетически модифицированными лимфоцитами. Данный вид терапии заключается в выделении из периферической крови пациентов Т-лимфоцитов и их последующей генетической модификацией *in vitro*, позволяющей клеткам синтезировать ТКР, которые смогут распознать заранее заданный ОАА, презентуемый на поверхности опухолевой клетки-мишени в комплексе с ГКГ. Результаты клинических исследований показали, что противоопухолевый ответ на такую терапию может достигать 30% [15]. Однако хорошо известно, что многие виды злокачественных опухолей могут избегать Т-клеточного иммунного ответа путем снижения или прекращения продукции клеткой ГКГ, через который происходит презентация антигена модифицированному ТКР [16]. В связи с этим для повышения эффективности клеточной терапии были созданы генетически модифицированные Т-лимфоциты с CAR рецепторами на поверхности, которые были названы CAR-T клетками. В большинстве случаев CAR-рецепторы на этих клетках состоят из внеклеточного антиген распознающего фрагмента, связанного с внутриклеточным доменом сигнализации, состоящего из костимулирующего домена

и участка Т-клеточной активации. Данные клетки выполняют такую же эффекторную функцию, как и Т-клетки с генетически модифицированным ТКР, но независимо от экспрессии ГКГ [17].

В настоящее время использование CAR-T клеток одобрено управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) США для лечения острого лимфобластного лейкоза, а также В-клеточных лимфом и хронического лимфолейкоза [18]. Однако несмотря на достигнутый успех, в клинической практике применение CAR-T клеток имеет существенные недостатки, связанные с эффективностью и безопасностью данного вида терапии. Во-первых, эффективность применения такой терапии обусловлена правильностью подбора поверхностного специфического опухолевого антигена, который, должен присутствовать на поверхности большинства опухолевых клеток и одновременно отсутствовать на поверхности здоровых клеток. Во-вторых, существуют серьезные побочные эффекты, среди которых можно выделить развитие у пациентов синдрома цитокинового шторма, приводящего в ряде случаев к летальному исходу, а также нейротоксического эффекта, патогенез которого до сих пор не установлен [19, 20]. Помимо указанных ограничений, следует отметить, что эффективность терапии CAR-T клетками во многом зависит от вида опухоли и ее микроокружения, что может обуславливать иммуносупрессивное воздействие на эти клетки [2].

Перспективным на сегодняшний день направлением для преодоления супрессорного иммунологического действия опухолевого микроокружения солидных опухолей является комбинированная терапия CAR-T клетками с ингибиторами ИКТ на основе моноклональных антител, которая уже применяется в клинических исследованиях [3, 21, 22]. Однако для этого вида терапии описаны системные побочные реакции, вызванные действием антител на аутореактивные Т-клетки пациента, и определение безопасности применения такой комбинации требует дополнительных исследований. Также с целью увеличения эффективности такой терапии используют технологию редактирования генома с помощью сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas) [23]. Технология CRISPR/Cas9 позволяет вносить разрывы в нуклеотидную последовательность генов-мишеней, что приводит к стойкой репрессии этих генов. Так было показано, что анти- CD19 CAR-T лимфоциты с «вырезанным» геном *PD-1* с помощью нуклеаз CRISPR/Cas9 демонстрируют более выраженную противоопухолевую эффективность в экспериментах *in vivo* [24]. Но несмотря на то, что технология редактирования генома в качестве инструмента ингибирования ИКТ способствует преодолению иммуносупрессивного воздействия опухоли и повышает противоопухолевую эффективность CAR-T клеток в экспериментах *in vitro*, остро встает проблема

безопасности такой терапии. Редактирование генома с нокаутом генов иммунных чек-пойнтов приводит к отключению регуляции иммунного контроля на весь период жизни лимфоцитов, вводимых пациенту, что влечет за собой возможные серьезные побочные эффекты аутоиммунной природы.

Таким образом, разработка новых методов, способных повысить эффективность и безопасность АКТ несет в себе большие перспективы для практической онкологии и позволит преодолеть существующие клинические проблемы. К настоящему времени все больше появляется данных, что одним из таких подходов для АКТ может выступать использование механизма РНК-интерференции [25].

РНК-интерференция. Малые интерферирующие РНК в качестве средств терапии онкологических заболеваний. Перспективы увеличения эффективности АКТ

С момента своего открытия (А. Fire и С. Mello, 1998) механизм РНКи превратился в эффективный метод подавления экспрессии генов (сайленсинга) в эукариотических клетках. В основе данной технологии лежит деградация матричной РНК (мРНК) гена-мишени и, как следствие, ингибирование трансляции белка при помощи малых интерферирующих РНК (миРНК).

К настоящему времени для использования механизма РНКи с целью подавления экспрессии генов в эукариотических клетках были разработаны две основные стратегии: введение в клетки синтетических молекул миРНК или внутриклеточная доставка коротких шпилечных РНК (shРНК, short hairpin RNA) в составе плазмидных векторов, которые после трансляции подвергаются внутриклеточному процессингу в активные миРНК (рис. 2) [26], представляющие собой короткие молекулы РНК длиной 21–25 нуклеотида с двумя неспаренными нуклеотидами на 3'-конце. Механизм РНКи включает в себя несколько этапов. На первом этапе происходит процессинг коротких двуцепочечных миРНК из длинных молекул предшественников при помощи рибонуклеазы Dicer. На следующем этапе осуществляется расплетание дуплексов миРНК ферментами геликазами, и одноцепочечная антисмысловая цепь миРНК включается в эффекторные рибонуклеопротеиновые комплексы RISC (RNA-induced silencing complex), состоящие в основном из белков семейства аргонавтов (Argonaute, Ago). Далее комплексы RISC с миРНК направляются к мРНК-мишени и комплементарно связываются с ней в участках, полностью комплементарных последовательности миРНК, после чего мРНК подвергается расщеплению белком Ago, за счет его эндонуклеазной активности [27, 28].

Сразу после открытия механизм РНКи стали использовать как специфичный и эффективный способ подавления экспрессии различных генов, в том числе

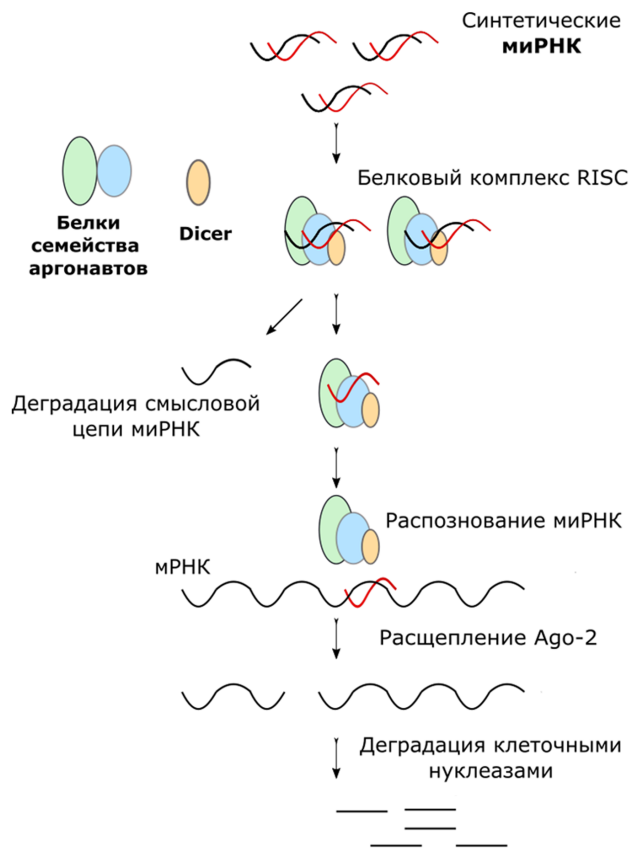


Рис. 2. Схематическое изображение механизма РНКи

участвующих в патогенезе злокачественных новообразований [29]. Гены, участвующие в процессе онкогенеза, неоангиогенеза, пролиферации и регуляции клеточного цикла широко используют в качестве мишеней при разработке таргетных (от англ. target-мишень) противоопухолевых препаратов на основе миРНК в экспериментах *in vitro*, а также на различных экспериментальных опухолевых моделях животных [30]. Такой активный интерес со стороны исследователей вызван тем, что использование миРНК для создания таргетных препаратов в лечении онкологических заболеваний имеет ряд преимуществ [31]. Так миРНК являются высокоспецифичными и действуют на уровне мРНК в отличие от малых молекул и моноклональных антител, мишенями которых являются белки. Конформационные изменения белков-мишеней вследствие точечных мутаций в кодирующих их генах могут приводить к развитию резистентности к противоопухолевой терапии препаратами на основе малых молекул и потребуют высокозатратной и длительной разработки препаратов нового поколения в отличие от простоты дизайна и экономической доступности химического синтеза нуклеотидной последовательности миРНК. В отличие от антител, направленных на рецепторы, локализованные на поверхности клеток, миРНК действуют непосредственно на мРНК гена данных белков и могут быть направлены на мишени любой клеточной локализации. Кроме того, таргетные

препараты для лечения онкологических заболеваний на основе миРНК могут включать в себя сразу комбинацию целого ряда миРНК для одновременного ингибирования нескольких генов-мишеней, а выбор мишеней может быть легко модифицирован в зависимости от конкретных клинических задач.

Следует отметить перспективность применения миРНК в случае АКТ для подавления экспрессии ИКТ в модифицированных CAR T-клетках. Ранее для этих целей была показана эффективность технологии CRISPR/Cas9 [27]. Однако применение миРНК в отличие от технологии редактирования генома позволяет добиваться временного подавления экспрессии целевых генов ИКТ в CAR-T-клетках, в связи с чем потенциально является более безопасным подходом. Недавние исследования продемонстрировали, что CAR-T клетки, трансфицированные молекулами миРНК против только PD-1 отдельно или в комбинации с миРНК против CTLA-4, показывают значительно большую цитотоксическую эффективность в отношении клеток меланомы по сравнению контрольными CAR-T клетками [4]. Помимо этого, было показано, что ОИЛ, экспансированные в присутствии миРНК против PD-1, также демонстрируют повышенный противоопухольевый эффект по сравнению с контролем [32].

Проблема доставки миРНК в клетки-мишени

К настоящему времени показано, что препараты на основе миРНК обладают рядом преимуществ по сравнению с существующими подходами таргетной терапии онкологических заболеваний. Однако препятствием на пути их клинического применения является разработка эффективного метода доставки миРНК в клетки-мишени, поскольку пассивное проникновение отрицательно заряженной с высоким молекулярным весом миРНК через мембрану клеток, которая также на своей поверхности несет отрицательный заряд, затруднено. Считается, что эффективная и безопасная система доставки миРНК в клетки при применении *in vivo* должна удовлетворять следующим условиям: защищать молекулы миРНК от деградации нуклеазами, позволять избегать быстрой почечной фильтрации, захвата системой мононуклеарных фагоцитов (макрофагов и клеток Купфера печени), обеспечивать транспорт молекул миРНК в опухолевые клетки-мишени, а также после проникновения внутрь клеток миРНК в комплексе с системой доставки должны быть способны высвободиться в цитоплазму для реализации своего биологического эффекта [27, 28]. Таким образом, система доставки должна формировать комплекс с миРНК, защищать от деградации эндонуклеазами, увеличивать длительность циркуляции в крови, эффективно доставлять в клетки-мишени и обладать механизмом высвобождения.

За последние годы достигнут значительный прогресс в области разработки терапевтических

средств на основе миРНК для лечения онкологических заболеваний с использованием различных способов доставки на основе невирусных носителей (векторов), включая липосомы, липидные наночастицы (ЛНЧ), катионные полимеры, аптамеры, проникающие в клетку пептиды как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* [33]. Общим для таких носителей является их положительный заряд, за счет которого происходит электростатическое взаимодействие и комплексообразование вектора с отрицательно заряженными молекулами миРНК. Полученные комплексы с носителями размером как правило до 1 мкм обеспечивают защиту миРНК от действия нуклеаз, проникновение миРНК в клетку путем эндоцитоза и/или макропиноцитоза и высвобождение из эндосомы в цитоплазму клетки для реализации механизма РНКи. Для реализации таргетности доставки часто используют модификацию системы доставки специфическими лигандами, способными связываться с определенным рецептором на поверхности клеток-мишеней [26].

Среди невирусных систем доставки наиболее перспективными являются ЛНЧ, первая система доставки миРНК, одобренная FDA для клинического применения. ЛНЧ представляют собой сферические замкнутые частицы, которые состоят из липидного бислоя, содержащего смесь катионных и фузогенных липидов, конъюгированных с молекулами полиэтиленгликоля (ПЭГ) [34]. Во внутреннюю водную фазу липидов «загружаются» молекулы миРНК во время приготовления ЛНЧ. Катионные липиды в составе ЛНЧ обеспечивают комплексообразование с миРНК и взаимодействие с отрицательно заряженными группами на поверхности клеточной мембраны, а фузогенные инициируют процесс эндоцитоза комплекса ЛНЧ/миРНК и эндосомального высвобождения миРНК в цитоплазму клеток. Оказавшись внутри эндосомы, низкий pH способствует протонированию липидов, что вызывает дестабилизацию эндосомальной мембраны и последующее высвобождение миРНК в цитозоль. Модификация ЛНЧ молекулой ПЭГ позволяет увеличивать время циркуляции в крови [35]. Большинство препаратов на основе миРНК, разработанные для лечения онкологических заболеваний и дошедшие до этапа клинических исследований, основаны на применении ЛНЧ в качестве средства доставки [36]. Первым препаратом на основе миРНК и ЛНЧ, одобренным FDA для лечения пациентов с редким наследственным заболеванием транстиретин-опосредованным амилоидозом, обусловленным накоплением патологической формы белка транстиретина в гепатоцитах, в 2018 г стал патисиран (Patisiran, ALN-TTR02, Alnylam Pharmaceuticals) [37]. Важно отметить, что доставка миРНК в органы-мишени с помощью ЛНЧ не универсальна и пока демонстрирует недостаточную эффективность при лечении патологических процессов другой локализации.

Основные подходы в разработке средств доставки миРНК в Т-лимфоциты. Проблемы и перспективы

Следует отметить, что широко используемые в экспериментальной практике и упомянутые системы доставки миРНК в клетки на основе катионных липидов, катионных полимеров, в том числе проникающих в клетки пептидов, не могут быть применимы в полной мере в отношении Т-лимфоцитов из-за низкой эффективности трансфекции миРНК в данные клетки. Это обусловлено низким суммарным отрицательным зарядом на мембране Т-лимфоцитов и как следствие снижением связывания с трансфецирующим комплексом [38, 39]. С целью повышения эффективности доставки такие системы доставки должны быть модифицированы клеточно-специфичными лигандами, такими как антитела и аптамеры, что усложняет производство, повышает стоимость таких препаратов.

На сегодняшний день существует несколько подходов для решения проблемы доставки миРНК в Т-лимфоциты человека, которые уже продемонстрировали успехи в экспериментах *in vitro*. Показана перспективность применения физических методов, таких как электро- и фотопорация, а также использование химических модификаций молекул миРНК, приводящих к возможности проникновения внутрь клетки без использования специальных носителей и конъюгирование миРНК со специфическими лигандами, такими как аптамеры.

Физические методы доставки миРНК в клетки

Электропорация и нуклеофекция

Электропорация представляет собой физический метод трансфекции, используемый для введения молекул нуклеиновых кислот (плазмидная ДНК, РНК) внутрь клетки. В основе метода лежит действие импульсов высокого напряжения на клетки, в результате которого образуются временные поры в билипидном слое мембраны, позволяя молекулам проникать в клетку (рис. 3А). Основным недостатком метода электропорации является снижение жизнеспособности клеток вследствие повреждения их электрическим импульсом чрезмерной продолжительности или интенсивности [40]. Для минимизации данных эффектов активно проводятся работы по оптимизации условий электропорации для различных клеточных культур. В этом отношении на сегодняшний день достигнут значительный успех, и данный метод применяется для доставки миРНК в первичные Т-лимфоциты (включая нестимулированные клетки) [41–43] с высокой эффективностью трансфекции (близкой к 95%) и минимальным влиянием на их жизнеспособность и функцию [44].

Еще одним перспективным методом доставки молекул нуклеиновых кислот в различные клеточные

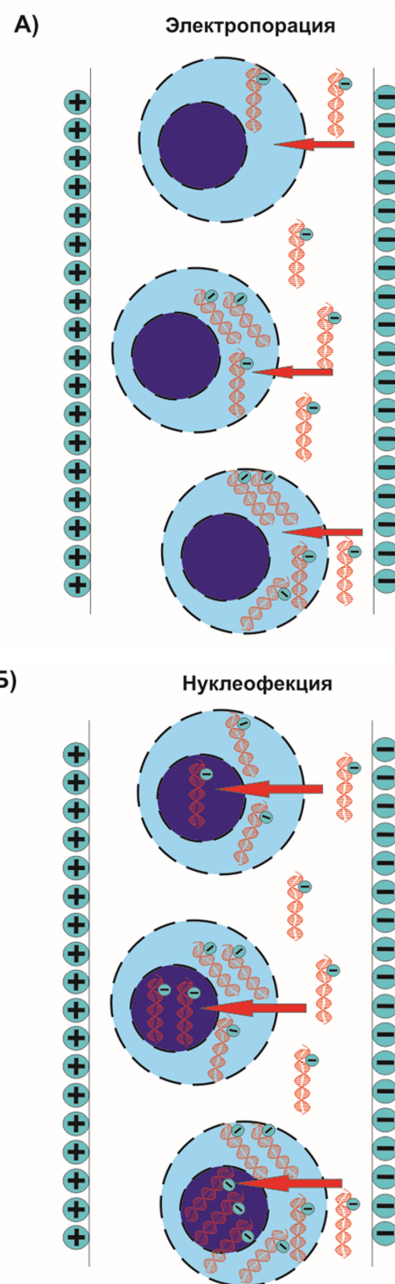


Рис. 3. Схематическое изображение методов электропорации (А) и нуклеофекции (Б)

культуры является нуклеофекция. В основе нуклеофекции также лежит метод электропорации, который демонстрирует большую эффективность доставки с сохранением жизнеспособности клеток за счет оптимизации условий ее проведения (рис. 3Б). Данный метод был изобретен и запатентован биотехнологической компанией Амаха, входящей в состав Lonza Group, в 2002 г. Использование данного подхода, а также предустановленных программ прибора, позволяет с высокой эффективностью проводить доставку нуклеиновых кислот в клетки различных линий, включая трудно трансфецируемые первичные клеточные культуры, такие как Т-лимфоциты. Так, было

показано, что Т-клетки, трансфицированные миРНК против PD-1, обладают более высокой цитотоксической активностью в отношении клеток меланомы по сравнению с контролем [45].

Однако, несмотря на высокую эффективность доставки миРНК в клетки у данного подхода также имеются недостатки. Использование предустановленных программ для проведения нуклеофекции приводит к невозможности оптимизировать протоколы для повышения эффективности трансфекции. Также следует отметить достаточно высокий процент погибших клеток при применении этой методики. Еще одним существенным недостатком как электропорации, так и нуклеофекции является большой расход миРНК (в десятки раз больше) по сравнению с другими методами трансфекции [46-48].

Фотопорация

Недавно был разработан принципиально новый физический метод трансфекции, основанный на применении золотых наночастиц и импульсного лазерного излучения [49, 50]. В основе данного подхода лежит проникновение макромолекул через плазматическую мембрану за счет фототермических эффектов от золотых наночастиц, прикрепленных к поверхности клетки, которые облучаются лазером (рис. 4).

Свойство поверхностного плазмонного резонанса позволяет золотым наночастицам эффективно преобразовывать свет в тепловую энергию. Короткие лазерные импульсы высокой интенсивности вызывают быстрое повышение температуры золотых наночастиц, испарение воды и образование наноразмерных пузырьков водяного пара [51]. В течение десятков наносекунд пузырьки водяного пара способствуют появлению волн высокого давления, вызывая локальное повреждение мембраны с обратимым образованием в ней пор, через которые миРНК, могут проникать в цитоплазму клетки [52, 53]. В тоже время при малой энергии излучения происходит локальный нагрев мембраны в местах прикрепления золотых наночастиц с последующим образованием пор за счет ло-

кального фазового перехода липидного бислоя) или термической денатурации интегральных гликопротеинов, через которые молекулы миРНК также могут проникать в клетки, но с меньшей эффективностью, чем в случае образования пор посредством пузырьков водяного пара. Кроме того, локальный нагрев мембраны может способствовать возникновению клеточной гипертермии и снижению жизнеспособности клеток [54]. В связи с этим наиболее предпочтительным способом доставки миРНК в клетки является фотопорация посредством коротких лазерных импульсов высокой интенсивности. Следует отметить, что данный метод доставки миРНК продемонстрировал свою эффективность на различных культурах клеток, включая трудно трансфицируемые первичные лимфоциты. При этом в сравнении с нуклеофекцией, фотопорация показала гораздо меньшее влияние на жизнеспособность клеток [40]. Полученные результаты доказывают потенциал метода фотопорации, как более совершенного альтернативного существующим на сегодня физическим методам доставки в первичные суспензионные клетки как для терапевтических, так и для диагностических целей. И хотя метод отличается меньшей токсичностью для клеток, остальные проблемы связанные с доставкой миРНК с использованием метода электропорации все еще остаются нерешенными.

Химически-модифицированные самодоставляемые миРНК

На сегодняшний день существует множество подходов химических модификаций нуклеиновых кислот, входящих в состав миРНК, позволяющих повысить ее устойчивость к действию РНКазы сыворотки крови, а также эффективность загрузки в комплексы RISC [55]. Однако наиболее перспективным является модификация за счет ковалентного конъюгирования миРНК с молекулами, увеличивающими тропность к клеточной мембране и обеспечивающими проникновение ее в клетку, которым относятся холестерин, различные пептиды, антитела, аптамеры и биополи-

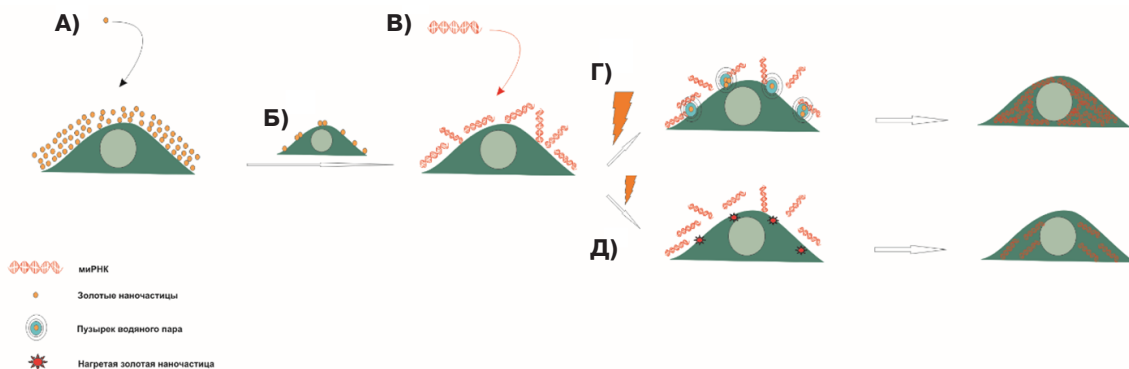


Рис. 4. Схема стандартного эксперимента по фотопорации клеток: А) адгезия золотых наночастиц на поверхности клеток; Б) отмывка клеток от не связанных наночастиц; В) инкубирование клеток в присутствии миРНК; Г) облучение клеток с использованием коротких (<10 нс) лазерных импульсов высокой интенсивности; Д) облучение клеток с использованием лазерного излучения небольшой интенсивности

меры с различными физико-химическими свойствами. Было показано, что присоединение 30-й группы холестерина к смысловой цепи миРНК облегчает ее проникновение в эукариотические клетки [56], и такие миРНК получили название «самодоставляемые» (англ. self-delivering) миРНК (рис. 5). Данный тип миРНК успешно использовался в экспериментах по РНКи в различных первичных иммунных клетках, включая макрофаги и Т-лимфоциты, а также на модели *in vivo* и несет в себе большой потенциал для дальнейшего клинического применения [57].

Недавно Ligtenberg и др. использовали данную стратегию для доставки PD-1-специфической миРНК в ОИЛ. Интересно отметить, что ОИЛ, экспансированные в присутствии миРНК против PD-1, проявляли более высокую цитотоксическую активность в отношении аутологических опухолей по сравнению с контрольными ОИЛ [32].

Аптамер-миРНК-конъюгаты

Аптамеры представляют собой большой класс синтетических одноцепочечных молекул ДНК или РНК (6–30 кДа), обладающих высокой селективной аффинностью к целевым белкам и рецепторам клетки за счет способности формировать определенную пространственную структуру. Для получения аптамеров используется технология SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения), которая позволяет проводить селекцию и наработку высокоаффинных последовательностей против целевых молекул различной природы (аминокислоты, пептиды, белки, антибиотики и др.). Аптамеры в качестве лекарственных средств сочетают

в себе преимущества моноклональных антител в виде высокой аффинности, специфичности, небольшого размера, низкой токсичности и иммуногенности вместе с простотой синтеза и модификации. В связи с чем аптамеры часто называют «химическими антителами» [58].

Несколько последних исследований продемонстрировали многообещающие результаты по доставке миРНК конъюгированных с аптамерами в Т-лимфоциты *in vivo* [59]. Для подобных экспериментов обычно используются аптамеры с высокой аффинностью и селективностью к антигенам лимфоцитов, конъюгированных с антисенс-нуклеотидами в том числе с миРНК для таргетной доставки и подавления экспрессии генов-мишеней [60]. В другом исследовании Herrmann и соавт. показали, что конъюгаты, состоящие из аптамера к CTLA-4 и миРНК против фактора транскрипции STAT3 эффективно проникают в супрессированные опухолью CD8+ Т-лимфоциты, Т-регуляторные клетки и CTLA4-экспрессирующие злокачественные Т-лимфоциты. Было обнаружено, что такие конъюгаты при системном введении ингибировали опухолевый рост и метастазирование на различных мышиных онкологических моделях, включая Т-клеточную лимфому [61].

Важно отметить, что существуют и препятствия для трансляции потенциальных препаратов на основе аптамеров и миРНК в клиническую практику, основным из которых является недостаточное эндосомальное высвобождение доставляемой молекулы в цитоплазму клетки. Было показано, что только 1–5% проникающих в клетку конъюгатов аптамер-миРНК способны высвобождаться в цитозоль клетки из состава эндосомы и загружаться в комплексы RISC [62]. Кроме того, требуется дальнейшее более глубокое

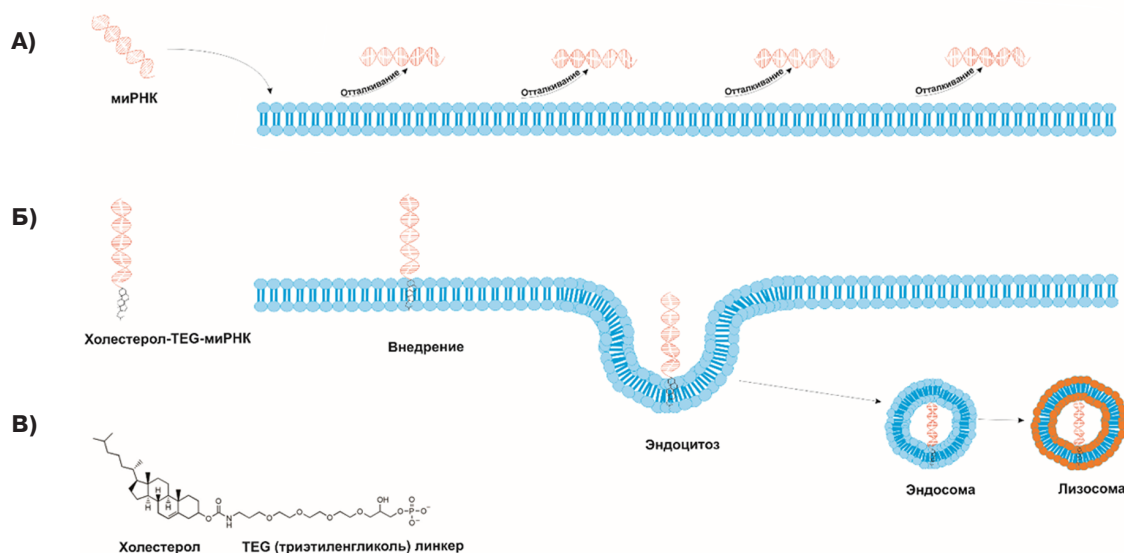


Рис. 5. Механизм проникновения в эукариотические клетки «самодоставляемых» миРНК [57]: А) проникновение не модифицированной миРНК внутрь клетки невозможно из-за отталкивания от отрицательно заряженной мембраны за счет кулоновских сил; Б) присоединение 30-й группы холестерина к смысловой цепи миРНК облегчает ее проникновение в эукариотические клетки; В) химическая структура холестерина с ТЕГ (триэтиленгликоль)-линкером

изучение фармакокинетики, фармакодинамики и потенциальной токсичности таких конъюгатов, прежде чем подобные препараты смогут войти в клиническую практику [63].

Заключение

Использование в клинической практике системной комбинированной терапии ИКТ на основе моноклональных антител в сочетании с методами АКТ за последнее десятилетие позволило улучшить прогноз пациентов со злокачественными новообразованиями различной локализации, однако, ее применение

все еще ограничено в связи с возникновением у пациентов иммуноопосредованных побочных эффектов. Также остается непонятным, какие именно комбинированные методы лечения оптимальны для эффективной трансляции их в клиническую практику. В связи с этим существующие данные по эффективности применения ИКТ на основе мРНК на стадиях доклинических разработок на различных опухолевых моделях, в том числе в качестве комплексной терапии с методами АКТ, обнадеживают и открывают перспективы разработки новых методов иммунотерапии для онкологических больных.

Список сокращений:

ИКТ – иммунные контрольные точки

АКТ – adoptивная клеточная терапия

миРНК – малые интерферирующие РНК

ОИЛ – опухоль-инфильтрирующие лимфоциты

CAR – химерные антигенные рецепторы

PD-1 – белок запрограммированной клеточной гибели 1

PD-L1 – лиганд белка программируемой клеточной гибели 1

CTLA-4 – цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4

РНКи – РНК-интерференция

АПК – антигенпрезентирующие клетки

ТКР – Т-клеточный рецептор

ОАА – опухоль-ассоциированный антиген

ГКГ, англ. МНС – главный комплекс гистосовместимости

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты

мРНК – матричная РНК

Аgo – белки семейства аргонатов

RISC – комплекс РНК-индуцированного сайленсинга

ЛНЧ – липидные наночастицы

ПЭГ – полиэтиленгликоль

Список литературы

1. *Robaan M.W., Wilgenhof S., Haanen J.* Adoptive cellular therapies: the current landscape // *Virchows Arch.* – 2019. – Vol. 474, № 4. – P. 449–461.
2. *Wang Z., Wu Z., Liu Y., Han W.* New development in CAR-T cell therapy // *J Hematol Oncol.* – 2017. – Vol. 10, № 1. – P. 53.
3. *Grosser R., Cherkassky L., Chintala N., Adusumilli P.S.* Combination Immunotherapy with CAR T Cells and Checkpoint Blockade for the Treatment of Solid Tumors // *Cancer Cell.* – 2019. – Vol. 36, № 5. – C. 471–482.
4. *Simon B., Harrer D.C., Schuler-Thurner B., Schaft N., Schuler G., Dorrie J., Uslu U.* The siRNA-mediated downregulation of PD-1 alone or simultaneously with CTLA-4 shows enhanced in vitro CAR-T-cell functionality for further clinical development towards the potential use in immunotherapy of melanoma // *Exp Dermatol.* – 2018. – Vol. 27, № 7. – P. 769–778.
5. *Chen L.* Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity // *Nat Rev Immunol.* – 2004. – Vol. 4, № 5. – P. 336–47.
6. *Schwartz R.H.* Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy // *Cell.* – 1992. – Vol. 71, № 7. – P. 1065–8.
7. *Chen D.S., Mellman I.* Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle // *Immunity.* – 2013. – Vol. 39, № 1. – C. 1–10.
8. *Ribas A.* Releasing the Brakes on Cancer Immunotherapy // *N Engl J Med.* – 2015. – Vol. 373, № 16. – P. 1490–2.
9. *Ramos-Casals M., Brahmer J.R., Callaban M.K., Flores-Chavez A., Keegan N., Khamashta M.A., Lambotte O., Mariette X., Prat A., Suarez-Almazor M.E.* Immune-related adverse events of checkpoint inhibitors // *Nat Rev Dis Primers.* – 2020. – Vol. 6, № 1. – P. 38.
10. *Korman A.J., Peggs K.S., Allison J.P.* Checkpoint blockade in cancer immunotherapy // *Adv Immunol.* – 2006. – Vol. 90. – P. 297–339.
11. *Spiess P.J., Yang J.C., Rosenberg S.A.* In vivo antitumor activity of tumor-infiltrating lymphocytes expanded in recombinant interleukin-2 // *J Natl Cancer Inst.* – 1987. – Vol. 79, № 5. – P. 1067–75.
12. *Gilham D.E., Anderson J., Bridgeman J.S., Hawkins R.E., Exley M.A., Stauss H., Maber J., Pule M., Sewell A.K., Bendle G., Lee S., Qasim W., Thrasher A., Morris E.* Adoptive T-cell therapy for cancer in the United Kingdom: a review of activity for the British Society of Gene and Cell Therapy annual meeting 2015 // *Hum Gene Ther.* – 2015. – Vol. 26, № 5. – P. 276–85.
13. *Besser M.J., Shapira-Frommer R., Itzhaki O., Treves A.J., Zippel D.B., Levy D., Kubi A., Shoshani N., Zikich D., Obayon Y., Obayon D., Shalmon B., Markel G., Yerushalmi R., Apter S., Ben-Nun A., Ben-Ami E., Shimoni A., Nagler A., Schachter J.* Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma: intent-to-treat analysis and efficacy after failure to prior immunotherapies // *Clin Cancer Res.* – 2013. – Vol. 19, № 17. – P. 4792–800.
14. *Paijens S.T., Vledder A., de Bruyn M., Nijman H.W.* Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era // *Cell Mol Immunol.* – 2021. – Vol. 18, № 4. – P. 842–859.

15. Johnson L.A., Morgan R.A., Dudley M.E., Cassard L., Yang J.C., Hughes M.S., Kammula U.S., Royal R.E., Sherry R.M., Wunderlich J.R., Lee C.C., Restifo N.P., Schwarz S.L., Cogdill A.P., Bishop R.J., Kim H., Brewer C.C., Rudy S.F., VanWaes C., Davis J.L., Mathur A., Ripley R.T., Nathán D.A., Laurencot C.M., Rosenberg S.A. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen // *Blood*. – 2009. – Vol. 114, № 3. – P. 535–46.
16. Garrido F., Ruiz-Cabello F., Aptsiauri N. Rejection versus escape: the tumor MHC dilemma // *Cancer Immunol Immunother.* – 2017. – Vol. 66, № 2. – P. 259–271.
17. Whilding L.M., Maber J. CAR T-cell immunotherapy: The path from the by-road to the freeway? // *Mol Oncol.* – 2015. – Vol. 9, № 10. – P. 1994–2018.
18. Chow V.A., Shadman M., Gopal A.K. Translating anti-CD19 CAR T-cell therapy into clinical practice for relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma // *Blood*. – 2018. – Vol. 132, № 8. – P. 777–781.
19. Grupp S.A., Kalos M., Barrett D., Aplenc R., Porter D.L., Rheingold S.R., Teachey D.T., Chew A., Hauck B., Wright J.F., Milone M.C., Levine B.L., June C.H. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia // *N Engl J Med.* – 2013. – Vol. 368, № 16. – P. 1509–1518.
20. Lee D.W., Kochenderfer J.N., Stetler-Stevenson M., Cui Y.K., Delbrook C., Feldman S.A., Fry T.J., Orentas R., Sabatino M., Shah N.N., Steinberg S.M., Stronck D., Tschernia N., Yuan C., Zhang H., Zhang L., Rosenberg S.A., Wayne A.S., Mackall C.L. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial // *Lancet*. – 2015. – Vol. 385, № 9967. – P. 517–528.
21. Hamid O., Robert C., Daud A., Hodi F.S., Hwu W.J., Kefford R., Wolchok J.D., Hersey P., Joseph R.W., Weber J.S., Dronca R., Gangadhar T.C., Patnaik A., Zarour H., Joshua A.M., Gergich K., Elassaiss-Schaap J., Algazi A., Mateus C., Boasberg P., Tumebl P.C., Chmielowski B., Ebbinghaus S.W., Li X.N., Kang S.P., Ribas A. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma // *N Engl J Med.* – 2013. – Vol. 369, № 2. – P. 134–44.
22. Wang H., Kaur G., Sankin A.I., Chen F., Guan F., Zang X. Immune checkpoint blockade and CAR-T cell therapy in hematologic malignancies // *J Hematol Oncol.* – 2019. – Vol. 12, № 1. – P. 59.
23. Liu X., Zhang Y., Cheng C., Cheng A.W., Zhang X., Li N., Xia C., Wei X., Liu X., Wang H. CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells // *Cell Res.* – 2017. – Vol. 27, № 1. – P. 154–157.
24. Rupp L.J., Schumann K., Roybal K.T., Gate R.E., Ye C.J., Lim W.A., Marson A. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 737.
25. Monty M.A., Islam M.A., Nan X., Tan J., Tubin I.J., Tang X., Miao M., Wu D., Yu L. Emerging role of RNA interference in immune cells engineering and its therapeutic synergism in immunotherapy // *Br J Pharmacol.* – 2021. – Vol. 178, № 8. – P. 1741–1755.
26. Rettig G.R., Beblke M.A. Progress toward in vivo use of siRNAs-II // *Mol Ther.* – 2012. – Vol. 20, № 3. – P. 483–512.
27. Ambros V. The functions of animal microRNAs // *Nature*. – 2004. – Vol. 431, № 7006. – P. 350–5.
28. Sioud M. Releasing the Immune System Brakes Using siRNAs Enhances Cancer Immunotherapy // *Cancers (Basel)*. – 2019. – Vol. 11, № 2.
29. Kim H.J., Kim A., Miyata K., Kataoka K. Recent progress in development of siRNA delivery vehicles for cancer therapy // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2016. – Vol. 104. – P. 61–77.
30. Singh A., Trivedi P., Jain N.K. Advances in siRNA delivery in cancer therapy // *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* – 2018. – Vol. 46, № 2. – P. 274–283.
31. Vaishnav A.K., Gollob J., Gamba-Vitalo C., Hutabarat R., Sab D., Meyers R., de Fougerolles T., Maraganore J. A status report on RNAi therapeutics // *Silence*. – 2010. – Vol. 1, № 1. – P. 14.
32. Ligtenberg M.A., Pico de Coana Y., Shmushkovich T., Yoshimoto Y., Truxova I., Yang Y., Betancur-Boissel M., Elisev A.V., Wolfson A.D., Kiessling R. Self-Delivering RNAi Targeting PD-1 Improves Tumor-Specific T Cell Functionality for Adoptive Cell Therapy of Malignant Melanoma // *Mol Ther.* – 2018. – Vol. 26, № 6. – P. 1482–1493.
33. Wittrup A., Lieberman J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics // *Nat Rev Genet.* – 2015. – Vol. 16, № 9. – P. 543–52.
34. Morrissey D.V., Lockridge J.A., Shaw L., Blanchard K., Jensen K., Breen W., Hartsough K., Machemer L., Radka S., Jadhav V., Vaish N., Zinnen S., Vargeese C., Bowman K., Shaffer C.S., Jeffs L.B., Judge A., MacLachlan I., Polisky B. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs // *Nat Biotechnol.* – 2005. – Vol. 23, № 8. – P. 1002–7.
35. Heyes J., Palmer L., Bremner K., MacLachlan I. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids // *J Control Release.* – 2005. – Vol. 107, № 2. – P. 276–87.
36. Sato Y., Nakamura T., Yamada Y., Harashima H. The nanomedicine rush: New strategies for unmet medical needs based on innovative nano DDS // *J Control Release.* – 2021. – Vol. 330. – P. 305–316.
37. Zhang X., Goel V., Robbie G.J. Pharmacokinetics of Patisiran, the First Approved RNA Interference Therapy in Patients With Hereditary Transthyretin-Mediated Amyloidosis // *J Clin Pharmacol.* – 2019.10.1002/jcph.1553.
38. Hurez V., Hutton R.D., Oliver J., Matthews R.J., Weaver C.K. Gene delivery into primary T cells: overview and characterization of a transgenic model for efficient adenoviral transduction // *Immunol Res.* – 2002. – Vol. 26, № 1–3. – P. 131–41.
39. June C.H., Blazar B.R., Riley J.L. Engineering lymphocyte subsets: tools, trials and tribulations // *Nat Rev Immunol.* – 2009. – Vol. 9, № 10. – P. 704–16.
40. Gebj. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research // *Acta Physiol Scand.* – 2003. – Vol. 177, № 4. – P. 437–47.

41. Ovcharenko D., Jarvis R., Hunicke-Smith S., Kelnar K., Brown D. High-throughput RNAi screening in vitro: from cell lines to primary cells // RNA. – 2005. – Vol. 11, № 6. – P. 985–93.
42. Kumii N., Zhao Y., Jiang S., Liu X., Scholler J., Balagopalan L., Samelson L. E., Milone M.C., June C.H. Enhanced function of redirected human T cells expressing linker for activation of T cells that is resistant to ubiquitylation // Hum Gene Ther. – 2013. – Vol. 24, № 1. – P. 27–37.
43. Saldanha-Araujo F., Haddad R., Farias K.C., Souza Ade P., Palma P.V., Araujo A.G., Orellana M.D., Voltarelli J.C., Covas D.T., Zago M.A., Panepucci R.A. Mesenchymal stem cells promote the sustained expression of CD69 on activated T lymphocytes: roles of canonical and non-canonical NF-kappaB signalling // J Cell Mol Med. – 2012. – Vol. 16, № 6. – P. 1232–44.
44. Mantei A., Rutz S., Janke M., Kirchhoff D., Jung U., Patzel V., Vogel U., Rudel T., Andreou I., Weber M., Scheffold A. siRNA stabilization prolongs gene knockdown in primary T lymphocytes // Eur J Immunol. – 2008. – Vol. 38, № 9. – P. 2616–25.
45. Freeley M., Long A. The two hit hypothesis: an improved method for siRNA-mediated gene silencing in stimulated primary human T cells // J Immunol Methods. – 2013. – Vol. 396, № 1–2. – P. 116–27.
46. Gresch O., Engel F.B., Nestic D., Tran T.T., England H.M., Hickman E.S., Korner I., Gan L., Chen S., Castro-Obregon S., Hammernann R., Wolf J., Muller-Hartmann H., Nix M., Siebenkotten G., Kraus G., Lun K. New non-viral method for gene transfer into primary cells // Methods. – 2004. – Vol. 33, № 2. – P. 151–63.
47. Moriwaki A., Inoue H., Nakano T., Matsunaga Y., Matsuno Y., Matsumoto T., Fukuyama S., Kan O.K., Matsumoto K., Tsuda-Eguchi M., Nagakubo D., Yoshie O., Yoshimura A., Kubo M., Nakanishi Y. T cell treatment with small interfering RNA for suppressor of cytokine signaling 3 modulates allergic airway responses in a murine model of asthma // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2011. – Vol. 44, № 4. – P. 448–55.
48. Hinterleitner R., Gruber T., Pfeifhofer-Obermair C., Lutz-Nicoladoni C., Tzankov A., Schuster M., Penninger J. M., Loibner H., Lametschwandner G., Wolf D., Baier G. Adoptive transfer of siRNA Cblb-silenced CD8+ T lymphocytes augments tumor vaccine efficacy in a B16 melanoma model // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 9. – P. e44295.
49. Wayteck L., Xiong R., Braeckmans K., De Smedt S.C., Raemdonck K. Comparing photoporation and nucleofection for delivery of small interfering RNA to cytotoxic T cells // J Control Release. – 2017. – Vol. 267. – P. 154–162.
50. Kalies S., Birr T., Heinemann D., Schomaker M., Ripken T., Heisterkamp A., Meyer H. Enhancement of extracellular molecule uptake in plasmonic laser perforation // J Biophotonics. – 2014. – Vol. 7, № 7. – P. 474–82.
51. Hu M., Chen J., Li Z. Y., Au L., Hartland G.V., Li X., Marquez M., Xia Y. Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications // Chem Soc Rev. – 2006. – Vol. 35, № 11. – P. 1084–94.
52. Lukianova-Hleb E., Hu Y., Latterini L., Tarpani L., Lee S., Drezek R.A., Hafner J.H., Lapotko D.O. Plasmonic nanobubbles as transient vapor nanobubbles generated around plasmonic nanoparticles // ACS Nano. – 2010. – Vol. 4, № 4. – P. 2109–23.
53. Lapotko D. Plasmonic nanoparticle-generated photothermal bubbles and their biomedical applications // Nanomedicine (Lond). – 2009. – Vol. 4, № 7. – P. 813–45.
54. Xiong R., Raemdonck K., Peynshaert K., Lentacker I., De Cock I., Demeester J., De Smedt S.C., Skirtach A.G., Braeckmans K. Comparison of gold nanoparticle mediated photoporation: vapor nanobubbles outperform direct heating for delivering macromolecules in live cells // ACS Nano. – 2014. – Vol. 8, № 6. – P. 6288–96.
55. Selvam C., Multisya D., Prakash S., Ranganna K., Thilagavathi R. Therapeutic potential of chemically modified siRNA: Recent trends // Chem Biol Drug Des. – 2017. – Vol. 90, № 5. – P. 665–678.
56. Soutschek J., Akinc A., Bramlage B., Charisse K., Constien R., Donoghue M., Elbashir S., Geick A., Hadwiger P., Harborth J., John M., Kesavan V., Lavine G., Pandey R.K., Racie T., Rajeev K.G., Robl I., Toudjarska I., Wang G., Wuschko S., Bumcrot D., Kotliansky V., Limmer S., Manoharan M., Vornlocher H.P. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs // Nature. – 2004. – Vol. 432, № 7014. – P. 173–8.
57. Shmushkovich T., Monopoli K.R., Homsy D., Leyfer D., Betancur-Boissel M., Khvorova A., Wolfson A.D. Functional features defining the efficacy of cholesterol-conjugated, self-deliverable, chemically modified siRNAs // Nucleic Acids Res. – 2018. – Vol. 46, № 20. – P. 10905–10916.
58. Zhou J., Rossi J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges // Nat Rev Drug Discov. – 2017. – Vol. 16, № 3. – P. 181–202.
59. Berezbnoy A., Castro I., Levay A., Malek T.R., Gilboa E. Aptamer-targeted inhibition of mTOR in T cells enhances antitumor immunity // J Clin Invest. – 2014. – Vol. 124, № 1. – P. 188–97.
60. Wheeler L.A., Trifonova R., Vrbanac V., Basar E., McKernan S., Xu Z., Seung E., Deruaz M., Dudek T., Einarsson J.I., Yang L., Allen T.M., Luster A.D., Tager A.M., Dykxboorn D.M., Lieberman J. Inhibition of HIV transmission in human cervicovaginal explants and humanized mice using CD4 aptamer-siRNA chimeras // J Clin Invest. – 2011. – Vol. 121, № 6. – P. 2401–12.
61. Herrmann A., Priceman S.J., Swiderski P., Kujawski M., Xin H., Cherryholmes G.A., Zhang W., Zhang C., Labt C., Kowolik C., Forman S.J., Kortylewski M., Yu H. CTLA4 aptamer delivers STAT3 siRNA to tumor-associated and malignant T cells // J Clin Invest. – 2014. – Vol. 124, № 7. – P. 2977–87.
62. Lachelt U., Wagner E. Nucleic Acid Therapeutics Using Polyplexes: A Journey of 50 Years (and Beyond) // Chem Rev. – 2015. – Vol. 115, № 19. – P. 11043–78.
63. Kruspe S., Giangrande P.H. Aptamer-siRNA Chimeras: Discovery, Progress, and Future Prospects // Biomedicines. – 2017. – Vol. 5, № 3.

References

1. *Robaan M.W., S. Wilgenhof and J. Haanen.* Adoptive cellular therapies: the current landscape. *Virchows Arch*, 2019. 474(4): 449-461.
2. *Wang Z. et al.* New development in CAR-T cell therapy. *J Hematol Oncol*, 2017. 10(1): 53.
3. *Grosser R., et al.* Combination Immunotherapy with CAR T Cells and Checkpoint Blockade for the Treatment of Solid Tumors. *Cancer Cell*, 2019. 36(5): 471-482.
4. *Simon B., et al.* The siRNA-mediated downregulation of PD-1 alone or simultaneously with CTLA-4 shows enhanced in vitro CAR-T-cell functionality for further clinical development towards the potential use in immunotherapy of melanoma. *Exp Dermatol*, 2018. 27(7): 769-778.
5. *Chen L.* Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol*, 2004. 4(5): 336-47.
6. *Schwartz R.H.* Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell*, 1992. 71(7): 1065-8.
7. *Chen D.S. and I. Mellman.* Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, 2013. 39(1): 1-10.
8. *Ribas A.* Releasing the Brakes on Cancer Immunotherapy. *N Engl J Med*, 2015. 373(16): 1490-2.
9. *Ramos-Casals M., et al.* Immune-related adverse events of checkpoint inhibitors. *Nat Rev Dis Primers*, 2020. 6(1): 38.
10. *Korman A.J., K.S. Peggs and J.P. Allison.* Checkpoint blockade in cancer immunotherapy. *Adv Immunol*, 2006. 90: 297-339.
11. *Spiess P.J., J.C. Yang and S.A. Rosenberg.* In vivo antitumor activity of tumor-infiltrating lymphocytes expanded in recombinant interleukin-2. *J Natl Cancer Inst*, 1987. 79(5): 1067-75.
12. *Gilham D.E., et al.* Adoptive T-cell therapy for cancer in the United Kingdom: a review of activity for the British Society of Gene and Cell Therapy annual meeting 2015. *Hum Gene Ther*, 2015. 26(5): 276-85.
13. *Besser M.J., et al.* Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma: intent-to-treat analysis and efficacy after failure to prior immunotherapies. *Clin Cancer Res*, 2013. 19(17): 4792-800.
14. *Pajjens S.T., et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era. *Cell Mol Immunol*, 2021. 18(4): 842-859.
15. *Johnson L.A., et al.* Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*, 2009. 114(3): 535-46.
16. *Garrido F., F. Ruiz-Cabello and N. Aptsiauri.* Rejection versus escape: the tumor MHC dilemma. *Cancer Immunol Immunother*, 2017. 66(2): 259-271.
17. *Whilding L.M. and J. Maher.* CAR T-cell immunotherapy: The path from the by-road to the freeway? *Mol Oncol*, 2015. 9(10): 1994-2018.
18. *Chow V.A., M. Shadman and A.K. Gopal.* Translating anti-CD19 CAR T-cell therapy into clinical practice for relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 2018. 132(8): 777-781.
19. *Grupp S.A., et al.* Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, 2013. 368(16): 1509-1518.
20. *Lee D.W., et al.* T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*, 2015. 385(9967): 517-528.
21. *Hamid O., et al.* Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med*, 2013. 369(2): 134-44.
22. *Wang H., et al.* Immune checkpoint blockade and CAR-T cell therapy in hematologic malignancies. *J Hematol Oncol*, 2019. 12(1): 59.
23. *Liu X., et al.* CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells. *Cell Res*, 2017. 27(1): 154-157.
24. *Rupp L.J., et al.* CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Sci Rep*, 2017. 7(1): 737.
25. *Monty M.A., et al.* Emerging role of RNA interference in immune cells engineering and its therapeutic synergism in immunotherapy. *Br J Pharmacol*, 2021. 178(8): 1741-1755.
26. *Rettig G.R. and M.A. Beblke.* Progress toward in vivo use of siRNAs-II. *Mol Ther*, 2012. 20(3): 483-512.
27. *Ambros V.* The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004. 431(7006): 350-5.
28. *Stoud M.* Releasing the Immune System Brakes Using siRNAs Enhances Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 2019. 11(2).
29. *Kim H.J., et al.* Recent progress in development of siRNA delivery vehicles for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016. 104: 61-77.
30. *Singh A., P. Trivedi and N.K. Jain.* Advances in siRNA delivery in cancer therapy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018. 46(2): 274-283.
31. *Vaishnav A.K., et al.* A status report on RNAi therapeutics. *Silence*, 2010. 1(1): 14.
32. *Ligtenberg M.A., et al.* Self-Delivering RNAi Targeting PD-1 Improves Tumor-Specific T Cell Functionality for Adoptive Cell Therapy of Malignant Melanoma. *Mol Ther*, 2018. 26(6): 1482-1493.
33. *Wittrup A. and J. Lieberman.* Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat Rev Genet*, 2015. 16(9): 543-52.

34. *Morrissey D.V., et al.* Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol*, 2005. 23(8): 1002-7.
35. *Heyes J., et al.* Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. *J Control Release*, 2005. 107(2): 276-87.
36. *Sato Y., et al.* The nanomedicine rush: New strategies for unmet medical needs based on innovative nano DDS. *J Control Release*, 2021. 330: 305-316.
37. *Zhang X., V. Goel and G.J. Robbie.* Pharmacokinetics of Patisiran, the First Approved RNA Interference Therapy in Patients With Hereditary Transthyretin-Mediated Amyloidosis. *J Clin Pharmacol*, 2019.
38. *Hurez V., et al.* Gene delivery into primary T cells: overview and characterization of a transgenic model for efficient adenoviral transduction. *Immunol Res*, 2002. 26(1-3): 131-41.
39. *June C.H., B.R. Blazar and J.L. Riley.* Engineering lymphocyte subsets: tools, trials and tribulations. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(10): 704-16.
40. *Gehl J.* Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand*, 2003. 177(4): 437-47.
41. *Ovcharenko D., et al.* High-throughput RNAi screening in vitro: from cell lines to primary cells. *RNA*, 2005. 11(6): 985-93.
42. *Kunii N., et al.* Enhanced function of redirected human T cells expressing linker for activation of T cells that is resistant to ubiquitylation. *Hum Gene Ther*, 2013. 24(1): 27-37.
43. *Saldanha-Araujo F., et al.* Mesenchymal stem cells promote the sustained expression of CD69 on activated T lymphocytes: roles of canonical and non-canonical NF-kappaB signalling. *J Cell Mol Med*, 2012. 16(6): 1232-44.
44. *Mantel A., et al.* siRNA stabilization prolongs gene knockdown in primary T lymphocytes. *Eur J Immunol*, 2008. 38(9): 2616-25.
45. *Freeley M. and A. Long.* The two hit hypothesis: an improved method for siRNA-mediated gene silencing in stimulated primary human T cells. *J Immunol Methods*, 2013. 396(1-2): 116-27.
46. *Gresch O., et al.* New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods*, 2004. 33(2): 151-63.
47. *Moriwaki A., et al.* T cell treatment with small interfering RNA for suppressor of cytokine signaling 3 modulates allergic airway responses in a murine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011. 44(4): 448-55.
48. *Hinterleitner R., et al.* Adoptive transfer of siRNA Cblb-silenced CD8+ T lymphocytes augments tumor vaccine efficacy in a B16 melanoma model. *PLoS One*, 2012. 7(9): e44295.
49. *Wayteck L., et al.* Comparing photoporation and nucleofection for delivery of small interfering RNA to cytotoxic T cells. *J Control Release*, 2017. 267: 154-162.
50. *Kalies S., et al.* Enhancement of extracellular molecule uptake in plasmonic laser perforation. *J Biophotonics*, 2014. 7(7): 474-82.
51. *Hu M., et al.* Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chem Soc Rev*, 2006. 35(11): 1084-94.
52. *Lukianova-Hleb E., et al.* Plasmonic nanobubbles as transient vapor nanobubbles generated around plasmonic nanoparticles. *ACS Nano*, 2010. 4(4): 2109-23.
53. *Lapotko D.* Plasmonic nanoparticle-generated photothermal bubbles and their biomedical applications. *Nanomedicine (Lond)*, 2009. 4(7): 813-45.
54. *Xiong R., et al.* Comparison of gold nanoparticle mediated photoporation: vapor nanobubbles outperform direct heating for delivering macromolecules in live cells. *ACS Nano*, 2014. 8(6): 6288-96.
55. *Selvam C., et al.* Therapeutic potential of chemically modified siRNA: Recent trends. *Chem Biol Drug Des*, 2017. 90(5): 665-678.
56. *Soutschek J., et al.* Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 2004. 432(7014): 173-8.
57. *Shmushkovich T., et al.* Functional features defining the efficacy of cholesterol-conjugated, self-deliverable, chemically modified siRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2018. 46(20): 10905-10916.
58. *Zhou J. and J. Rossi.* Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 2017. 16(3): 181-202.
59. *Bereznoi A., et al.* Aptamer-targeted inhibition of mTOR in T cells enhances antitumor immunity. *J Clin Invest*, 2014. 124(1): 188-97.
60. *Wheeler L.A., et al.* Inhibition of HIV transmission in human cervicovaginal explants and humanized mice using CD4 aptamer-siRNA chimeras. *J Clin Invest*, 2011. 121(6): 2401-12.
61. *Herrmann A., et al.* CTLA4 aptamer delivers STAT3 siRNA to tumor-associated and malignant T cells. *J Clin Invest*, 2014. 124(7): 2977-87.
62. *Lachelt U. and E. Wagner.* Nucleic Acid Therapeutics Using Polyplexes: A Journey of 50 Years (and Beyond). *Chem Rev*, 2015. 115(19): 11043-78.
63. *Kruspe S. and P.H. Giangrande.* Aptamer-siRNA Chimeras: Discovery, Progress, and Future Prospects. *Biomedicine*, 2017. 5(3).