

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-2-31-41>

Современные иммунотерапевтические таргетные системы доставки гранзимов в лечении злокачественных новообразований

И.В. Ярош¹, В.А. Мисюрин², И.И. Краснюк¹

¹ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Илья Валерьевич Ярош ilya96yarosh@gmail.com

Основное свойство, которым обладают киллерные клетки человека, – цитотоксичность. Реакция цитотоксичности киллерных клеток человека достигается при помощи комплекса молекул, в том числе перфоринов, гранзима, катепсина и др. При этом для гибели клеток-мишеней достаточно всего 1 молекулы – гранзима, тогда как остальные молекулы предназначены для его активации и доставки в цитоплазму клеток-мишеней.

Предметом настоящего обзора являются гранзимы, которые представляют собой семейство сериновых протеаз и выполняют свою функцию в организме человека как интегральные цитолитические эффекторы во время программируемой клеточной смерти раковых и патоген-инфицированных клеток. Секретируемые преимущественно цитотоксическими Т-лимфоцитами и натуральными киллерами, гранзимы осуществляют инициацию апоптоза по каспазозависимым и каспазозависимым путям. Данные природные свойства делают гранзимы одними из наиболее перспективных человеческих ферментов для использования при разработке целевых терапевтических стратегий в лечении различных видов рака. При этом наиболее привлекательным является гранзим В, так как он обладает наиболее сильными эффекторными свойствами. К настоящему времени разработано несколько подходов для доставки молекул гранзима к опухолевым клеткам и облегчения его проникновения через клеточную мембрану. Более того, предлагаются некоторые решения по преодолению резистентности клеток-мишеней к гранзим-опосредованному апоптозу.

Цель данного обзора литературы – систематизация информации о применении гранзима В в исследованиях как компонента наноструктурных систем доставки лекарственных препаратов для лечения солидных и гематологических злокачественных новообразований. Кроме того, в настоящем обзоре рассмотрены преимущества и сложности использования гранзимов.

Ключевые слова: гранзимы, перфорин, цитотоксические Т-лимфоциты, натуральные киллеры, катепсин С

Для цитирования: Ярош И.В., Мисюрин В.А., Краснюк И.И. Современные иммунотерапевтические таргетные системы доставки гранзимов в лечении злокачественных новообразований. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(2):31–41. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-31-41.

Novel immunotherapeutic targeted granzyme delivery systems in treatment of malignant tumors

Ilya V. Yarosh¹, Vsevolod A. Misyurin², Ivan I. Krasnyuk¹

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of Russia; Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Contacts: Ilya Valerievich Yarosh ilya96yarosh@gmail.com

Cytotoxicity is the main human killer cell property. The cytotoxicity reaction of human killer cells is achieved through a complex of molecules, including perforins, granzyme, cathepsin and others. However, only one molecule is enough for target cell death: granzyme. Other molecules are intended for granzyme activation and its delivery

to the target cell cytoplasm. Granzymes are a whole family of serine proteases that perform their function in the human body as integral cytolytic effectors during programmed cell death of cancer and pathogen-infected cells. Secreted mainly by cytotoxic T-lymphocytes and NK-cells, granzymes initiate apoptosis via caspase-dependent and caspase-independent pathways. These natural properties make granzymes one of the most promising human enzymes for use in the development of targeted therapeutic strategies in the treatment of various types of cancer. The most promising is granzyme B, because it has the most powerful effector properties. Due to the initiation of cascade reactions that activate apoptosis, granzyme is attractive as a basis for the development of medicines applicable in clinical oncology. At this time, several approaches have been developed for delivering granzyme molecules to tumor cells and facilitating its penetration through the cell membrane. Moreover, some solutions are proposed to overcome the resistance of target cells to granzyme-mediated apoptosis. These approaches are discussed in this review.

The purpose of this review was to systematize information on the use of granzyme B as a nanostructured drug delivery system in the treatment of solid and hematological malignancies. In addition, this review discusses ways to overcome the resistance of granzyme penetration into target cells.

Key words: granzymes, perforin, cytotoxic T-lymphocytes, natural killer cells, cathepsin C

For citation: Yarosh I.V., Misyurin V.A., Krasnyuk I.I. Novel immunotherapeutic targeted granzyme delivery systems in treatment of malignant tumors. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(2):31–41. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-31-41.

Введение

Гранзимы — это группа протеолитических ферментов, сериновых протеаз, которые в основном экспрессируются, хранятся и специфически высвобождаются из цитоплазматических гранул цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) и натуральных киллеров (НК) для атаки клеток-мишеней. Гранзимы выполняют важную инициативную роль активации апоптоза в инфицированных и злокачественных клетках. Гранзим-опосредованный апоптоз проходит как по «классическому» пути — через активацию каспаз, сопровождаясь фрагментацией ДНК, так и с некоторыми свойствами некроза, такими как деградация плазматической мембраны [1–3].

Впервые гранзимы были очищены и охарактеризованы исследовательской группой Jürg Tschopp в 1987 г. Первоначально другой гранулированный белок, перфорин (также известный как цитолизин), считался единственным медиатором разрушения клеток-мишеней. Однако D. Masson и J. Tschopp, работая с линией мышей В6.1, доказали значимую роль гранзимов в активации апоптоза. Всего было очищено 8 типов гранзимов (А, В, С, D, E, F, G, H) мышей, частично определена их структура и субстратная специфичность. Два из них соответствуют белкам, кодируемым генами цитотоксической клеточной протеазы (ССР), клонированными лабораторией Bleackley. На протяжении 5 лет молекулы неофициально назывались Grs, до тех пор пока исследовательская группа лаборатории Bleackley не признала это наименование [3].

Типы гранзимов, их функции и отличия

У людей экспрессируются 5 типов гранзимов: А, В, Н, К и М, в то время как у мышей — 11 типов. Гранзим А (ГрА) и гранзим В (ГрВ) являются наиболее биологически значимыми и экспрессируются чаще,

чем другие гранзимы, и поэтому наиболее изучены. ГрА ведет себя как триптаза благодаря тому, что расщепляет субстраты с основными остатками в положении Р1 (аргинин и лизин). ГрА синтезируется в качестве неактивного белка-предшественника и активируется, когда катепсин С удаляет N-терминальный дипептид. ГрА при попадании в митохондрии разрушает цепь переноса электронов. Вследствие этого образуется синглетный кислород — активная форма кислорода, токсичная для клеток-мишеней. Кроме того, ГрА инициирует апоптоз клеток-мишеней путем активации белка, называемого SET, который отменяет ингибирование 2-го белка, NME-1. Интересно, что человеческий ГрА не был цитотоксичным при введении в опухолевые клетки человека или мыши, тогда как мышинный белок проявлял сильную цитолитическую активность. Гранзимы, по-видимому, эволюционировали видоспецифичным образом, как посредством дупликации генов, так и посредством вариативности субстрата [2, 4–6].

ГрВ представляет собой 32 кДа аспартилсериновую протеазу, содержащуюся в основном в цитотоксических гранулах ЦТЛ, НК-клеток и лимфокин-активируемых киллеров [5–7]. Он также известен как ЦТЛ-ассоциированная серинэстераза 1 или протеиназа цитотоксических клеток 1 (ССР1), или гранзим 2, или фрагментин-2. Ген, кодирующий ГрВ, имеет длину ~3500 п. н., содержит 5 экзонов и 4 интрона и расположен на 14-й хромосоме человека. ГрВ является наиболее мощным из всех гранзимов человека, продуцируемых ЦТЛ. Из-за своей цитотоксической природы он экспрессируется как неактивный препрофермент и становится функциональным благодаря удалению 2 пропептидных остатков (дипептида Gly-Glu с его N-конца) лизосомальной дипептидилпептидазой I/катепсином С. Человеческий ГрВ

в 30 раз более цитотоксичен, чем мышинный белок, что было определено *in vitro* при совместной инкубации различных опухолевых клеток с очищенным перфорином и гранзимами [8].

Биологическая активность ГрВ во время опосредованного ЦТЛ или НК-клетками иммунного ответа зависит от совместного высвобождения с порообразующим белком, называемым перфорином, к клеткам-мишеням в межклеточных пространствах, называемых иммунологическими синапсами [9, 10]; успешного проникновения в цитозоль клетки (процесс, который до сих пор широко обсуждается и есть предположение, что он должен быть опосредован перфорином либо через образование пор в клеточной мембране, либо через дестабилизацию ионного градиента для образования пор в эндосомальных пузырьках) [11]; активации нескольких проапоптотических путей через протеолитическую атаку нескольких внутриклеточных белковых субстратов.

В настоящее время известно до 300 внутриклеточных субстратов, расщепляемых ГрВ. Из них только малая часть участвует в апоптозе, опосредованном ГрВ [5–8]. Среди субстратов наиболее значимыми являются члены семейства каспаз-3, -6, -7, -8, -9, -10 и проапоптотический белок (Bid). Ядерный проапоптотический путь связан с человеческим ГрВ и включает расщепление регуляторных белков клеточного цикла и/или активацию циклинзависимых киназ (CDC). Кроме того, был описан потенциал ГрВ для непосредственного запуска посткаспазного цитоплазматического пути апоптотической гибели. Способность активировать множественные пути индукции апоптоза (включая индукцию фрагментации ДНК) в клетках-мишенях позволяет проводить разработку наноструктурных систем доставки на основе ГрВ, что может быть привлекательным решением для терапии различных видов рака [5].

Гранзимы М, Н и F вызывают гибель клеток, которая сопровождается выходом цитохрома С из митохондрий [12]. Классы ферментов белков-гранзимов имеют следующие функции: гранзим Н представляет собой химазу, гранзим К — триптазу (подобно А) и гранзим М — метазу [2].

Механизм действия гранзима – активация апоптоза в неопластических клетках

В организме человека доставку гранзимов к опухолевым и патоген-инфицированным клеткам осуществляют ЦТЛ и НК-клетки [4, 13, 14]. Адгезия ЦТЛ, лимфокин-активируемых киллеров и НК-клеток с клетками-мишенями приводит к образованию иммунологического синапса. После этого цитотоксические секреторные гранулы, содержащие гранулизин, перфорины, гранзимы и катепсин С, движутся

вдоль микротрубочек в цитоплазме киллерных клеток и высвобождаются в область синапса [15].

Вопрос о способе проникновения гранзима в клетку-мишень разрешен не до конца. Недавние исследования показали, что перфорины необходимы для повреждения мембран, в то время как гранзимы необходимы для быстрой фрагментации ДНК клеток-мишеней. Перфорин может способствовать цитолизу посредством 2 различных механизмов. При одном механизме гранулизин изменяет проницаемость мембраны и облегчает вставку перфорина в клеточные мембраны-мишени; перфорин образует гомополимерные поры, через которые гранзимы проникают в клетку-мишень. При другом механизме белок, известный как серглицин, собирает комплекс гранулизина, перфорина и гранзимов в иммунном синапсе между эффекторными клетками и клетками-мишенями; комплекс поглощается клетками-мишенями с помощью рецепторопосредованного эндоцитоза и помещается в цитоплазматическую эндосому; гранулизин и перфорин создают поры в эндосомальной мембране, через которые выделяют гранзимы в цитоплазму [4–7, 16].

На данный момент существуют 2 основные модели, описывающие доставку гранзима в цитоплазму клетки-мишени: модель «взрыва везикул» и модель «доставки пор». В соответствии с моделью «взрыва везикул» гранзимы, высвобождаемые в синаптическое пространство, могут связывать рецепторы маннозы-6-фосфата (M6P, MPR) непосредственно на поверхности клеток-мишеней, эндоцитозироваться и высвобождаться в цитоплазму, вызывая апоптоз. Дальнейшие исследования подтвердили эту модель, показав, что сульфат гепарина (среди других протеогликанов), связанный с рецепторами M6P, как стабилизировал, так и усиливал поглощение ГрВ *in vitro* в отсутствие перфорина [1, 5–8]. Однако *in vivo* это наблюдение имеет сомнительное значение, поскольку перфорин необходим для цитотоксического эффекта, опосредованного через путь экзоцитоза гранул. Другая модель, называемая моделью «доставки пор», соответствует требованию к эффективному гранулированному уничтожению и считается «классическим» механизмом [5]. Он характеризуется диффузией гранзимов через поры полиперфорина в цитоплазму из пузырьков *de novo*, возникших в результате эндоцитоза клеткой-мишенью [1, 2].

Хотя MPR и перфорин, как полагают, важны для доставки ГрВ, несколько исследовательских групп сообщили об альтернативном механизме проникновения ГрВ в клетку. Этот процесс может облегчаться другими белками, связанными с клеточной поверхностью, такими как белок теплового шока 70 (Hsp70). Hsp70, присутствующий на поверхности опухолевых клеток, не только облегчает движение ГрВ в опухолевую

клетку, но также стимулирует выработку и доставку ГрВ НК-клетками [5]. Таким образом, в качестве преобладающего механизма иммуноопосредованного апоптоза был предложен путь ГрВ/перфорин. После высвобождения в цитоплазму клетки-мишени путем перфорированного или рецепторопосредованного эндоцитоза ГрВ может воздействовать на субстраты в цитозоле и ядре, индуцировать апоптоз несколькими путями, как показано на рис. 1:

- 1) связывание комплекса ГрВ с рецептором на клеточной мембране;
- 2) внедрение комплекса в клетку;
- 3) маршрутизация и обработка в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи, приводящая к эндосомальному выходу ГрВ;
- 4) активный ГрВ высвобождается в цитозоль клетки-мишени;
- 5) прямое расщепление ядерного материала;
- 6) инициирование митохондриального/каспазе-зависимого пути апоптоза: ГрВ расщепляет про-каспазу-8, превращая ее в активную каспазу-8. Каспаза-8 расщепляет BID, ингибирующий апоптоз, приводя к активации «усеченной формы» проапоптотического белка Bid (t-Bid). T-Bid транслируется в митохондриях и активирует проапоптотический белок BAX. Это приводит к на-

рушению проницаемости митохондриальной наружной мембраны (MOMP) и высвобождению цитохрома C, Smac/DIABLO и Omi/HTRA2, которые способствуют блокированию ингибитора апоптоза (AIP). Цитохром C связывается с активирующим апоптотическую протеазу фактором (Araf-1) в присутствии dATP, что приводит к образованию апоптосомы, которая расщепляет прокаспазу-9. Активированная каспаза-9 расщепляет прокаспазу-3 и -7;

- 7) инициирование каспазозависимого пути: ГрВ непосредственно расщепляет прокаспазу-3 и -7, приводя к активации каспаз-исполнителей 3 и 7. Эти каспазы расщепляют прокаспазу-6, приводя к активации каспазы-6. Каспаза-3, -6 и -7 расщепляют нижележащие субстраты, такие как PARP поли(АДФ-рибоза)-полимераза, DNA-PK (ДНК-зависимая протеинкиназа), ламин В и ICAD (ингибитор активированной каспазой ДНКазы).

Таким образом, ГрВ, доставляемый в основном ЦТЛ и НК-клетками, служит для активации механизма клеточной гибели клеток-мишеней. Вследствие этого на основе данного белка могут быть созданы препараты, обладающие цитотоксическим эффектом, который может проявляться в том числе и против опухолевых клеток.

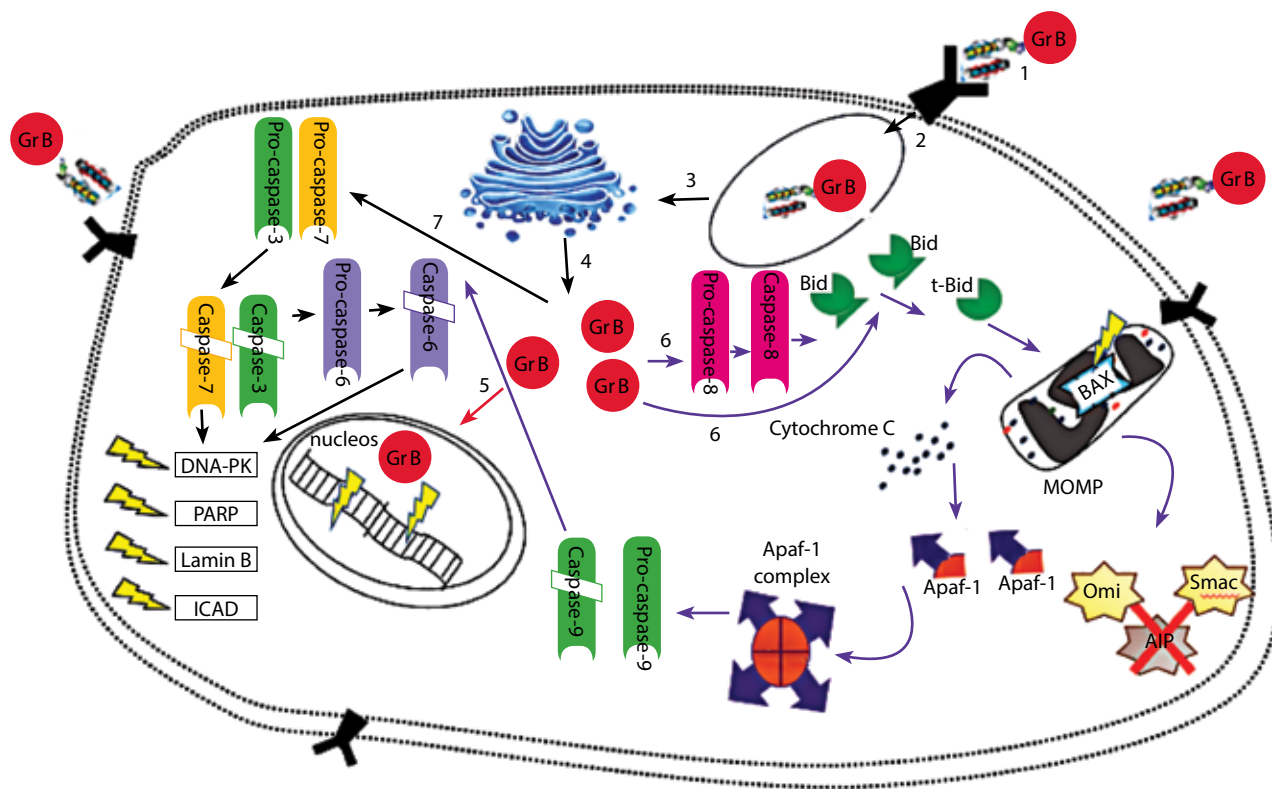


Рис. 1. Классический механизм действия таргетной доставки гранзима В (GrB) к опухолевой клетке перфорированным путем (см. описание в тексте) [1, 2, 4–7]

Fig. 1. The classical mechanism of action of granzyme B (GrB) targeted delivery to a tumor cell by a perforine pathway (explanations in the text) [1, 2, 4–7]

Опыт международных исследований по применению гранзима В

Ввиду способности гранзима активировать апоптоз, неоднократно проводились попытки его использования в качестве терапевтического агента. Разработка таргетных терапевтических средств на основе гранзимов сопровождается рядом проблем. На поверхности GrB содержится ряд основных аминокислот, вследствие чего для белка характерна высокая изоэлектрическая точка. Это приводит к неспецифическому связыванию или поглощению GrB отрицательно заряженными клетками. Более того, подобное свойство увеличивает вероятность иммуногенности, тем самым снижая терапевтический потенциал иммунотоксина [17]. Ферментативная активность GrB строго контролируется присутствием ингибитора серпина B9 (PI-9, также известного как ингибитор протеиназы 9). PI-9 необходим для защиты ЦТЛ и окружающих клеток в случае спонтанного высвобождения GrB.

PI-9 — природный ингибитор апоптоза, представляет собой протеазу, которая инактивирует другие протеазы, в том числе GrB. Инактивирование достигается путем простой ассоциации 1 молекулы PI-9 с 1 молекулой GrB и ее последующим расщеплением [18, 19]. Как известно, синаптическое высвобождение GrB из ЦТЛ может вызвать «братоубийство» и «самоубийство» ЦТЛ и НК-клеток. Это происходит, когда GrB возвращается обратно в иммунную клетку. Кроме того, секретируемый GrB может подвергнуться эндоцитозу ЦТЛ или окружающими клетками, высвободиться в цитоплазме после эндолизомного стресса, кульминацией которого является «братоубийство» и/или «самоубийство» путем GrB-опосредованного апоптоза. Все эти негативные эффекты GrB успешно подавляются PI-9 [20].

Однако PI-9 может экспрессироваться не только в нормальных или киллерных клетках, но также и в опухолевых. В случае значительной активности PI-9 делает методы лечения на основе GrB неэффективными. Чтобы устранить эти недостатки, некоторые исследователи вносили изменения в структуру GrB [18, 19]. К настоящему моменту известно о нескольких подходах, позволяющих решить или обойти эти проблемы. Около 10 лет назад использование GrB в таргетной терапии было начато лабораториями Майкла Дж. Розенблюма (MD Anderson Cancer Center, Хьюстон, Техас, США) и Стефана Барта (IDM, Факультет медицинских наук, Университет Кейптауна, Южная Африка). Суть разработки заключалась в слиянии фрагмента антитела или производного природного лиганда с карбоксильным концом GrB. Полученная форма нацеливала поверхностный белок или рецептор на опухолевую клетку. Соответствующие гибридные белки, называемые иммунопротеазами,

подвергались селективному лиганд-опосредованному поглощению и доставке GrB в клетки-мишени при отсутствии перфорина (см. рис. 1) [21]. Было разработано несколько вариантов цитолитических химерных белков человека (hCFP) на основе GrB, направленных на разные поверхностные белки на клетках-мишенях для различных заболеваний (табл. 1) [22–25].

Разрабатывались и другие подходы по доставке активного GrB в цитозоль клеток-мишеней после системного применения без каких-либо терапевтических ограничений. Данные по улучшенным версиям химерных цитолитических белков человека на основе GrB, произведенных исследователями F.C. Kurschus, C.H. Bird и др. за последнее десятилетие, представлены в табл. 2 и 3 [17, 26–28].

Было показано, что гибридный белок GrB-H22 (scFv) эффективен в уничтожении клеток CD64+ U937 (лимфобластов легких человека) и клеток пациентов с острым миелоидным лейкозом, экспрессирующих CD64 на поверхности [29]. Значительная активация каспазы-3 в лизате клеток, обработанных GrB, по сравнению с необработанным контролем, подтвердила способность гибридного белка GrB-H22 (scFv) инициировать апоптоз в клетках-мишенях [30].

Используя аналогичный подход, группа М.Дж. Розенблюма в своих ранних исследованиях также продемонстрировала терапевтический потенциал конструкций на основе GrB. Слияние GrB с одноцепочечным фрагментом антитела против меланомы (scFvMEL), нацеленным на клетки меланомы A375-M человека, вызывало апоптоз через 8 ч после обработки. Результаты показали, что такие пути апоптоза, как расщепление каспазы-3 и высвобождение цитохрома С из митохондрий в цитозольный компартмент, опосредованы конструкцией GrB-scFvMEL [30]. Таким образом, несколько цитолитических гибридных белков на основе GrB были разработаны для терапии различных карцином [18, 20, 30, 31].

В другом международном исследовании J. Yang и соавт. выявили потенциальную цитотоксическую роль GrB крупного рогатого скота в уничтожении клеток, инфицированных паразитом *Theileria parva* [32].

Кроме того, есть международный опыт исследования роли GrA в уничтожении бактерий штамма *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), однако он отрицательный [33]. В данной работе S. Uranga и соавт. сообщают, что ранее было проанализировано влияние перфорина и GrA на течение туберкулезной инфекции *in vivo*, но эти молекулы не имеют существенного вклада в бактериальный клиренс. Результаты проведенного исследования показали, что, хотя GrA экспрессируется цитотоксическими клетками в легких мышей во время течения легочной инфекции,

Таблица 1. Цитолитические химерные белки человека (hCFP) на основе гранзима В, устойчивые к ингибированию серпина В9, направленные на поверхностные белки, экспрессируемые при различных злокачественных заболеваниях [22–25]

Table 1. Human cytolytic chimeric proteins (hCFP) based on granzyme B, resistant to inhibition of serpin B9, targeting surface proteins expressed in various cancers [22–25]

Конструкция гранзима В Granzyme B variant	Показание Indication	Мишень Target	Клеточные линии Cell lines	Экспрессия Р1-9 на клеточной линии P1-9 expression in cell line	Цитотоксичность Cytotoxicity	Источник литературы Reference
GrB (wt)-H22 (scFv), GrBR201K-H22 (scFv)	ХММЛ CMML	CD64+	Клетки от пациентов с ОММЛ и ХММЛ Cells from AMML and CMML patients	Да Yes	Не указано Not specified	[22]
			CD64+ HL60	Нет No	4–7 нМ 4–7 nM	
GrB (wt)-ki4 (scFv), GrBR201K-Ki4 (scFv)	κЛХ cHL	CD30+	L428	Да Yes	—	[23]
			L540cy	Нет No	—	
GrBR201K-scFv1711	Эпидермоидные раковые клетки Epidermoid cancer cells	EGFR+	A431	Да Yes	133,3 нМ 133.3 nM	[24]
			RD-таргетные клетки RD target cells	Да Yes	21,1 нМ 21.1 nM	
GrBR201K-αEpCAM (scFv)	ТНРМЖ TNBC	EpCAM+	MDA-MB-231	Да Yes	Не указано Not specified	[25]
			MDA-MB-468	Да Yes	221 нМ 221 nM	
			MDA-MB-453	Нет No	307 нМ 307 nM	

Примечание. ОММЛ — острый миеломоноцитарный лейкоз; ХММЛ — хронический миеломоноцитарный лейкоз; κЛХ — классическая лимфома Ходжкина; ТНРМЖ — трижды негативный рак молочной железы.

Note. AMML — acute myelomonocytic leukemia; CMML — chronic myelomonocytic leukemia; cHL — classical Hodgkin's lymphoma; TNBC — triple-negative breast cancer.

его дефицит у нокаутных мышей не влияет на контроль инфекции *M. tuberculosis*. GrA не оказывает должного цитотоксического эффекта в отношении туберкулезной инфекции [33]. Кроме того, исследование показало, что отсутствие GrA не влияет на защиту, вызываемую живой аттенуированной вакциной против *M. tuberculosis* МТВВАС [34]. В целом результаты авторов находятся в явном противоречии с ранее опубликованными результатами *in vitro* и предполагают, что GrA не играет решающей роли *in vivo* в защитном ответе на туберкулезную инфекцию.

В 2019 г. было проведено международное исследование с участием китайских ученых X. Qian и соавт., посвященное конструированию таргетной системы доставки на основе GrB [34]. В качестве основного механизма апоптоза принят GrB/перфориновый механизм. Авторы создавали компонент, который бы

обладал такими же мембранолитическими — поробразующими свойствами, как и перфорин. В качестве такого вещества исследователями был использован пептид ТАТ, который в комплексе с GrB не только имитировал функцию перфорины, но и улучшил способность GrB проникать в клетки и инициировать апоптоз клеток-мишеней. Разработанный положительно заряженный конъюгированный комплекс GrB-Т был упакован в специальные наночастицы (называемые TCiGNPs) с помощью модифицированной p-2-метакрилоилоксиэтилфосфорилхолином (ПМФХ) гиалуриновой кислоты (ГК) для внеклеточного высвобождения комплекса GrB-Т. Полученные наночастицы (TCiGNPs) обладали способностью накапливаться в солидных опухолях благодаря эффекту повышенной проницаемости и удержания. ГК будет по своей природе нацеливаться на раковые

Таблица 2. Модифицированные формы гранзима В (GrB) для улучшения специфического связывания и снижения токсичности вне мишени
Table 2. Modified forms of granzyme B (GrB) for improved specific binding and reduced off-target toxicity

Конструкция гранзима В Granzyme B variant	Мутация Mutation	Последствия мутации Implication of mutation	Результат Result	Источник литературы Reference
GzmB ^{FacD}	Последовательность kktmkp на С-конце заменена кислотным пептидом DSVLA человеческого комплементного фактора D The kktmkp sequence at the C-terminus was replaced with the acidic peptide DSVLA derived from human complement factor D	Этот мотив последовательности не является положительно заряженным и должен обладать небольшим иммунотенным потенциалом, поскольку фактор комплемента D встречается на относительно высоких уровнях в плазме человека This sequence motif is not positively charged and should have little immunogenic potential because complement factor D occurs at relatively high levels in human plasma	Связывание с клетками HL60 было полностью отменено Binding to HL60 cells was completely abolished	[26]
GzmB ^{KD}	Область вокруг K127 и K131 функционирует как сайт связывания гепарина в тромбине. Чтобы стабилизировать это, оба лизина были заменены остатками аспаргата The region around K127 and K131 is known to function as a heparin binding site in thrombin. To stabilize this, both lysines were replaced with aspartate residues	Уменьшено связывание HS Reduced HS binding	Снижение связывания с клетками HL60 по сравнению с GrB дикого типа Reduced binding to HL60 cells compared to wild type GrB	[26]
GzmB ^{KD-FacD}	Двойной мутант, состоящий из замены аспаргата в положении K127 и K131 и кислотного С-концевого пептида DSVLA Double mutant consisting with aspartate replacement at position K127 and K131 and the acidic C-terminal peptide DSVLA	Совокупный эффект мутации Combined effect of mutation	Эффективность связывания и интернализации была полностью отменена The binding and internalization efficiency was completely abolished	[26]
cs1	Аргинин в положениях 110, 114 и 116 (R110, R114 и R116) заменен аланином. Составляет измененный классический GAG-связывающий мотив Arginine in position 110, 114 and 116 (R110, R114, and R116) replaced with alanine. Constitutes an altered classical GAG-binding motif	Большинство белков связывают GAG. Мутация в этой области изменяет связывание GrB с отрицательно заряженными клетками Most proteins bind GAG. Mutation in this region alters binding of GrB to negatively charged cells	Цитотоксичность в 20 раз меньше по сравнению с GrB дикого типа. Связывание с гепариновой областью не происходит Reduced cytotoxic activity, 20-fold less cytotoxic compared to wild type Gr B. Abolished binding to Heparin region	[17]
cs2	Лизин в положениях 239, 240, 243 и 244 (K239, K240, K243 и K244) заменен аланином. Составляет измененную С-концевую спираль Lysine in position 239, 240, 243 and 244 (K239, K240, K243, and K244) replaced with alanine. Constitutes an altered C-terminal helix	Амфипатическая С-концевая спираль с парными основными остатками, связывающими GAG. Мутация в этой области изменяет связывание GrB с отрицательно заряженными клетками Amphipathic C-terminal helix that has paired basic residues that bind GAGs. Mutation in this region alters binding of GrB to negatively charged cells	Цитотоксичность в 2,5 раза ниже по сравнению с GrB дикого типа. Связывание с областью гепарина уменьшено Reduced cytotoxic activity, 2.5-fold less cytotoxic compared to wild type Gr B. Reduced binding to Heparin region	[17]
cs1 + cs2	Комбинированная мутация cs1 и cs2 Combined mutation of cs1 and cs2	Комбинированная мутация cs1 и cs2 Combined mutation of cs1 and cs2	Цитотоксичность в 20 раз меньше по сравнению с GrB дикого типа. Связывание с гепариновой областью не происходит Reduced cytotoxic activity, 20-fold less cytotoxic compared to wild type Gr B. Abolished binding to Heparin region	[17]

Таблица 3. Модифицированные формы граназима В для улучшения цитотоксичности и обхода ингибирования серпина В9

Table 3. Modified forms of granzyme B to improve cytotoxicity and bypass the inhibition of serpin B9

Конструкция граназима В Granzyme B variant	Мутация Mutation	Последствия мутации Implication of mutation	Источник литературы References
R28A	Замена остатка аргинина аланином (составляет нейтральный заряд в положении 28) Substitution of arginine residue with alanine (constitutes a neutral charge at position 28)	В присутствии PI-9 мутант GrBR28A сохраняет 54 % активности In the presence of PI-9 the GrBR28A mutant contains 54 % activity	[27]
R28E	Замена остатка аргинина глутаматом (составляет противоположный заряд в положении 28) Substitution of arginine residue with glutamate (constitutes an opposite charge at position 28)	В присутствии PI-9 мутант GrBR28E сохраняет 25 % активности In the presence of PI-9 the GrBR28E mutant contains 25 % activity	[27]
R28K	Замена остатка аргинина лизинном (составляет идентичный заряд в положении 28) Substitution of arginine residue with lysine (constitutes an identical charge at position 28)	В присутствии PI-9 GrBR28K и мутанты сохранили 76 % их исходной активности In the presence of PI-9, the GrBR28K and mutants retained 76 % of their original activity	[27]
R201A	Замена остатка аргинина аланином (составляет нейтральный заряд в положении 201) Substitution of arginine residue with alanine (constitutes a neutral charge at position 201)	В присутствии PI-9 мутанты GrBR201A сохранили 46 % своей исходной активности In the presence of PI-9, the GrBR201A mutants retained 46 % of their original activity	[27]
R201E	Замена остатка аргинина глутаматом (составляет противоположный заряд в положении 201) Substitution of arginine residue with glutamate (constitutes an opposite charge at position 201)	Неактивен в присутствии PI-9 No activity in the presence of PI-9	[27]
R201K	Замена остатка аргинина лизинном (составляет одинаковый заряд в положении 28) Substitution of arginine residue with lysine (constitutes an identical charge at position 28)	В присутствии PI-9 мутант GrBR201K сохранил 94 % своей активности In the presence of PI-9, the GrBR201K mutant retained 94 % of its activity	[27]
K27A	Замена остатка лизина аланином (составляет нейтральный заряд в положении 27) Substitution of lysine residue with alanine (constitutes a neutral charge at position 27)	Нечувствительный к активности PI-9 и мутант K27A показали заметное снижение способности связывать и расщеплять субстрат (субстрат 3), содержащий остатки PI-9 Insensitive to PI-9 activity and K27A mutant showed a marked decrease in the ability to bind and cleave a substrate (substrate 3) containing PI-9 residues	[27]
R28A & R201A	Двойной мутант; аргинин заменен на аланин в положении 28 и 201 Double mutant; arginine replaced with alanine at position 28 and 201	В присутствии PI-9 двойной мутант сохраняет 0,5 % активности In the presence of PI-9 the double mutant contains 0.5 % activity	[27]
K27E & R28A (EA)	Двойной мутант; лизин заменен на глутамат в положении 27, а аргинин заменен на аланин в положении 28 Double mutant; lysine replaced with glutamate at position 27 and arginine replaced with alanine at position 28	В присутствии 50 % человеческой сыворотки ферментативная активность EA сохранялась на уровне более 40 % в течение 24 ч In the presence of 50 % human serum, the enzymatic activity of EA remained over 40 % over 24 h	[28]
K27L & R28A (LA)	Двойной мутант; лизин заменен на лейцин в положении 27, а аргинин заменен на аланин в положении 28 Double mutant; lysine replaced with leucine at position 27 and arginine replaced with alanine at position 28	LA двойной мутант, по-видимому, ведет себя промежуточно по отношению к белку дикого типа (GrB/VEGF121) и конструкции EA LA double mutant appeared to behave intermediate to the wild-type protein (GrB/VEGF121) and the EA construct	[28]

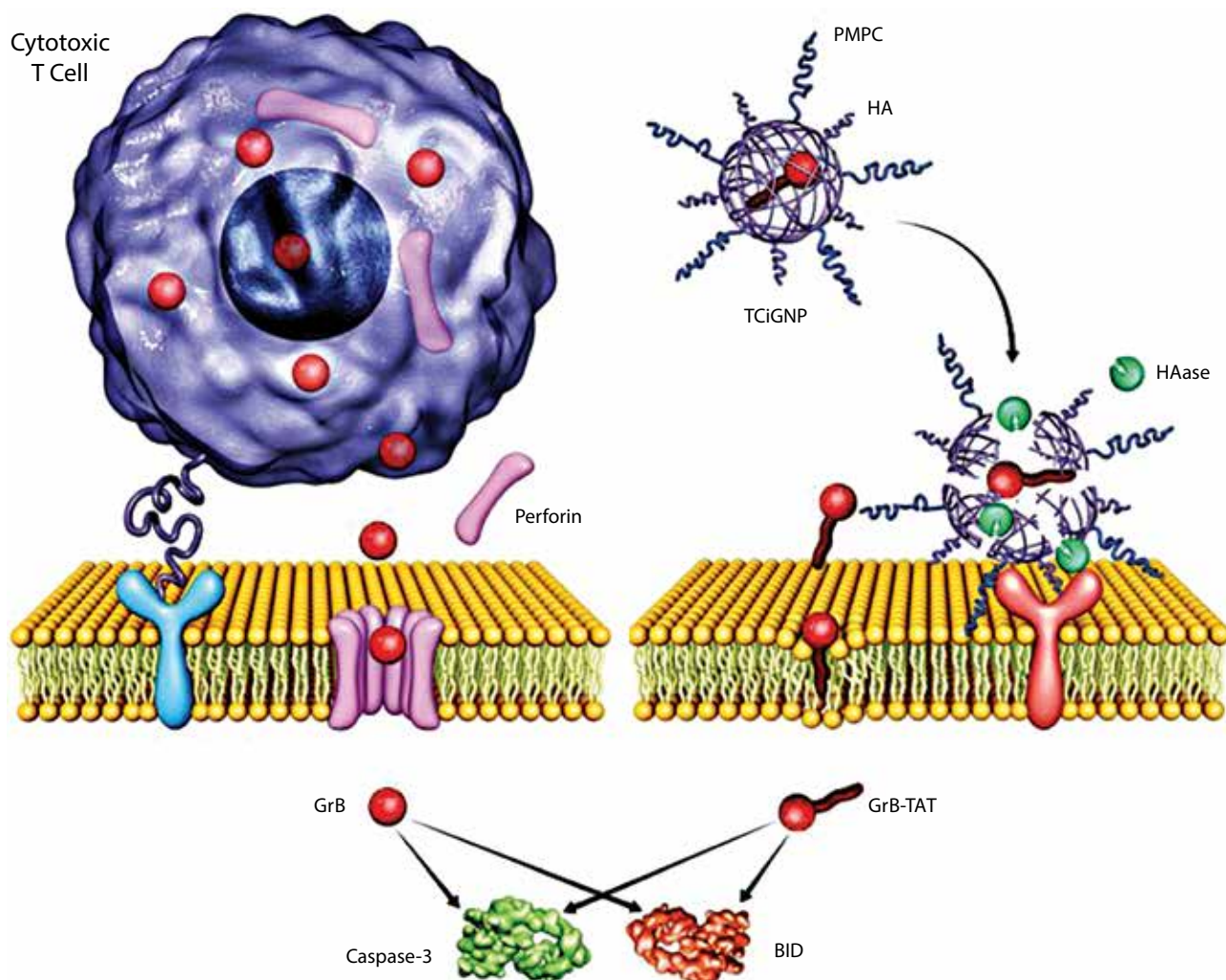


Рис. 2. Системы доставки гранзима В (Gr B), которые функционально и структурно имитируют цитотоксические Т-лимфоциты (Cytotoxic T-Cell, CTL) для уничтожения раковых клеток-мишеней [34]: а – CTL доставляют GrB непосредственно в цитозоль клетки-мишени через поры плазматической мембраны, образованные перфорином; б – система доставки, состоящая из наночастиц TCiGNP, которые содержат ядро Gr B-T (Gr B-TAT) и оболочку гиалуроновая кислота/р-2-метакрилоилэтилфосфорилхолин (HA/PMPC)

Fig. 2. Granzyme B (Gr B) delivery system, which functionally and structurally mimics cytotoxic T-lymphocytes (Cytotoxic T-Cell, CTLs) to destroy target cancer cells [34]: a – CTLs deliver Gr B directly to the cytosol via plasma membrane pores formed by perforin; б – TCiGNPs have a Gr B-TAT core and an HA/PMPC shell

клетки из-за экспрессии CD44 на опухолевых клетках. Однако из-за экранирующего эффекта ПМФХ частицы TCiGNP задерживаются на поверхности клетки до тех пор, пока оболочки ГК не разрушаются гиалуронидазой, сверхэкспрессируемой в микроокружении опухоли, вызывая высвобождение GrB-T. При попадании в цитозоль клеток-мишеней GrB-T стимулирует апоптоз клеток 2 основными путями: либо через BID-зависимую проницаемость митохондрий, либо посредством прямой обработки и активации каспазы, что приводит к значительному противоопухолевому эффекту, как изображено на рис. 2. Результаты исследований показали, что система доставки на основе наночастиц TCiGNP имитировала процесс распознавания иммунными клетками клеток-мишеней, а также продемонстрировала значи-

тельное подавление опухоли на модели животных *in vivo*. Таким образом, удалось разработать новую систему доставки GrB с ядром GrB-T и оболочкой ПМФХ/ГК, которая имитировала механизм иммунотерапии рака, опосредованной ЦТЛ и НК-клетками [34]. Эта система доставки решает проблему неспособности GrB самостоятельно проходить через клеточную мембрану [10, 35].

Не остались в стороне и российские исследователи, которые также разработали современную систему доставки GrB с функциональными суперпарамагнитными наночастицами оксида железа [36]. Суперпарамагнитные наночастицы оксида железа появились в качестве потенциальных клинических инструментов для тераностики рака. Связанный с мембраной белок теплового шока 70 кДа (Hsp70)

экспрессируется на клеточной мембране различных типов опухолей и представляет специфическую опухолевую мишень, так как на поверхности нормальных клеток не вырабатывается. Было показано, что ГрВ, который продуцируется в качестве эффекторной молекулы ЦТЛ и НК-клетками, специфически нацелен на Hsp70 на опухолевых клетках. После связывания с Hsp70 ГрВ быстро проникает в опухолевые клетки. В ходе исследования авторы выяснили, что комплексное соединение ГрВ с суперпарамагнитными наночастицами действует как агент, усиливающий контраст для магнитно-резонансной томографии и индуцирует специфический апоптоз опухолевых клеток. Кроме того, авторы определили, что комбинаторные схемы, использующие стереотаксическую лучевую терапию и/или магнитное нацеливание, дополнительно повышают терапевтическую эффективность комплексного исследуемого соединения в различных ксенографтных моделях с опухолями [36].

Подобные системы доставки ГрВ имеют большие перспективы для лечения рака, аналогично иммунотерапии, индуцированной ЦТЛ и НК-клетками.

Заключение

Проанализировав опыт применения систем доставки ГрВ в клетки солидных и гематологических опухолей, мы приходим к выводу, что ГрВ имеет перспективы в лечении рака, аналогично иммунотерапии, проводимой при помощи ЦТЛ или НК-клеток.

Для увеличения эффективности доставки ГрВ в клетку-мишень его можно модифицировать. Так, заменив несколько аминокислотных остатков, выступающих на поверхности белка, можно привести изоэлектрическую точку к нейтральному значению. Кроме того, можно создать химерные белки, состоящие из собственно ГрВ и фрагмента антитела, содержащего вариабельный участок, позволяющий связаться с поверхностью клетки-мишени. В то же время проблема ингибирования цитотоксической активности решается посредством синтеза белка с заменами аминокислот, делающих ГрВ нечувствительным для PI-9. Перспективы разработки противоопухолевого препарата на основе гранзима этим не исчерпываются. Таргетные системы доставки ГрВ привлекательны в качестве основы для создания лекарственных препаратов, применимых в клинической онкологии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kataoka T., Nagai K. Molecular dissection of cytotoxic functions mediated by T cells. *ProGrBiotechnol* 2002;22:13–23. DOI: 10.1016/S0921-0423(02)80039-9.
- De Armas L.R., Podack E.R. Natural killer cytolytic activity. In: *Natural Killer Cells*. Ed. by M.T. Lotze, A.W. Thomson. Elsevier Ltd., 2010. Pp. 215–227. DOI: 10.1016/B978-0-12-370454-2.00016-8.
- Masson D., Tschopp J. A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. *Cell* 1987;49(5):679–85. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90544-7.
- Bladergroen B.A., Meijer C.J., ten Berge R.L. et al. Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? *Blood* 2002;99(1):232–7. DOI: 10.1182/blood.v99.1.232.
- Boivin W.A., Cooper D.M., Hiebert P.R., Granville D.J. Intracellular *versus* extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma. *Lab Invest* 2009;89(11):1195–220. DOI: 10.1038/labinvest.2009.91.
- Granville D.J. Granzymes in disease: bench to bedside. *Cell Death Differ* 2010;17(4):565–6. DOI: 10.1038/cdd.2009.218.
- Pinkoski M.J., Hobman M., Heibein J.A. et al. Entry and trafficking of granzyme B in target cells during apoptosis. *Blood* 1998;92(3):1044–54. PMID: 9680374.
- Cremer C., Hehmann-Titt G., Schiffer S. et al. Engineered Versions of Granzyme B and Angiogenin Overcome Intrinsic Resistance to Apoptosis Mediated by Human Cytolytic Fusion Proteins. In: *Resistance to Immunotoxins in Cancer Therapy*. Ed. by R.S. Verma, B. Bonavida. Springer, 2015. Pp. 185–219. DOI: 10.1007/978-3-319-17275-0_8.
- Kurschus F.C., Fellows E., Stegmann E., Jenne D.I. Granzyme B delivery via perforin is restricted by size, but not by heparan sulfate-dependent endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(37):13799–804. DOI: 10.1073/pnas.0801724105.
- Besenčar M.P., Metkar S., Wang B. et al. Granzyme B translocates across the lipid membrane only in the presence of lytic agents. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;371(3):391–4. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.04.071.
- Bots M., Medema J.P. Granzymes at a glance. *J Cell Sci* 2006;119(24):5011–14. DOI:10.1242/jcs.03239.
- Киселевский Д.Б. Гранзимы и митохондрии. *Биохимия* 2020;85(2):155–64. [Kiselevskiy D.B. Granzymes and mitochondria. *Biokhimiya = Biochemistry* 2020;85(2):155–64. (In Russ.)]. DOI: 10.31857/S0320972520020013.
- Bird C.H., Christensen M.E., Mangan M.S.J. et al. The granzyme B-Serpin9 axis controls the fate of lymphocytes after lysosomal stress. *Cell Death Differ* 2014;21(6):876–7. DOI: 10.1038/cdd.2014.7.
- Cullen S.P., Martin S.J. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ* 2008;15(2):251–62. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402244.
- Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003;3(5):361–70. DOI: 10.1038/nri1083.
- Voskoboinik I., Dunstone M.A., Baran K. et al. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev* 2010;235(1):35–54. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2010.00896.x.
- Bird C.H., Sun J., Ung K. et al. Cationic Sites on Granzyme B Contribute to Cytotoxicity by Promoting Its Uptake into Target Cells. *Mol Cell Biol* 2005;25(17):7854–67. DOI: 10.1128/mcb.25.17.7854-7867.2005.
- Azzi J., Ohori S., Ting C. et al. Serine protease inhibitor-6 differentially affects the survival of effector

- and memory alloreactive CD8-T cells. *Am J Transplant* 2015;15(1):234–41. DOI: 10.1111/ajt.13051.
19. Ashton-Rickardt P.G. An emerging role for Serine Protease Inhibitors in T lymphocyte immunity and beyond. *Immunol Lett* 2013;152(1):65–76. DOI: 10.1016/j.imlet.2013.04.004.
 20. Kaiserman D., Bird P.I. Control of granzymes by serpins. *Cell Death Differ* 2010;17(4):586–95. DOI: 10.1038/cdd.2009.169.
 21. Rosenblum M.G., Barth S. Development of novel, highly cytotoxic fusion constructs containing granzyme B: Unique mechanisms and functions. *Curr Pharm Des* 2009;15(23):2676–92. DOI: 10.2174/138161209788923958.
 22. Schiffer S., Rosinke R., Jost E. et al. Targeted *ex vivo* reduction of CD64-positive monocytes in chronic myelomonocytic leukemia and acute myelomonocytic leukemia using human granzyme B-based cytolytic fusion proteins. *Int J Cancer* 2014;135(6):1497–508. DOI: 10.1002/ijc.28786.
 23. Mathew M., Verma R.S. Humanized immunotoxins: a new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy. *Cancer Sci* 2009;100(8):1359–65. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01192.x.
 24. Niesen J., Hehmann-Titt G., Wötker M. et al. A novel fully-human cytolytic fusion protein based on granzyme B shows *in vitro* cytotoxicity and *ex vivo* binding to solid tumors overexpressing the epidermal growth factor receptor. *Cancer Lett* 2016;374(2):229–40. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.02.020.
 25. Amoury M., Kolberg K., Pham A.T. et al. Granzyme B-based cytolytic fusion protein targeting EpCAM specifically kills triple negative breast cancer cells *in vitro* and inhibits tumor growth in a subcutaneous mouse tumor model. *Cancer Lett* 2016;372(2):201–9. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.01.027.
 26. Kurschus F.C., Kleinschmidt M., Fellows E. et al. Killing of target cells by redirected granzyme B in the absence of perforin. *FEBS Lett* 2004;562(1–3):87–92. DOI: 10.1016/s0014-5793(04)00187-5.
 27. Losasso V., Schiffer S., Barth S., Carloni P. Design of human granzyme B variants resistant to serpin B9. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2012;80(11):2514–22. DOI: 10.1002/prot.24133.
 28. Mohamedali K.A., Cheung L.H., Rosenblum M.G. Tumor-targeted fusion constructs containing engineered granzyme B variants with optimized stability and potency. *Cancer Res* 2015;75(15 suppl):632. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2015-632.
 29. Stahnke B., Thepen T., Stöcker M. et al. Granzyme B-H22(scFv), a human immunotoxin targeting CD64 in acute myeloid leukemia of monocytic subtypes. *Mol Cancer Ther* 2008;7(9):2924–32. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-08-0554.
 30. Alimonti J.B., Shi L., Bajjal P.K., Greenberg A.H. Granzyme B Induces BID-mediated Cytochrome c Release and Mitochondrial Permeability Transition. *J Biol Chem* 2001;276(10):6974–82. DOI: 10.1074/jbc.m008444200.
 31. D'Eliseo D., Pisu P., Romano C. et al. Granzyme B is expressed in urothelial carcinoma and promotes cancer cell invasion. *Int J Cancer* 2009;127(6):1283–94. DOI: 10.1002/ijc.25135.
 32. Yang J., Pemberton A., Morrison W.I., Connelley T. Granzyme B Is an Essential Mediator in CD8⁺ T Cell Killing of *Theileria parva*-infected cells. *Infect Immun* 2018;87(1):e00386–18. DOI: 10.1128/iai.00386-18.
 33. Uranga S., Marinova D., Martin C. et al. Granzyme A is expressed in mouse lungs during *Mycobacterium tuberculosis* infection but does not contribute to protection *in vivo*. *PLoS One* 2016;11(4):e0153028. DOI: 10.1371/journal.pone.0153028.
 34. Qian X., Shi Z., Qi H. et al. A novel Granzyme B nanoparticle delivery system simulates immune cell functions for suppression of solid tumors. *Theranostics* 2019;9(25):7616–27. DOI: 10.7150/thno.35900.
 35. Schanoski A.S., Le T.T., Kaiserman D. et al. Granzyme A in Chikungunya and Other Arboviral Infections. *Front Immunol* 2020;10:3083. DOI: 10.3389/fimmu.2019.03083.
 36. Shevtsov M., Stangl S., Nikolaev B. et al. Granzyme B Functionalized Nanoparticles Targeting Membrane Hsp70-Positive Tumors for Multimodal Cancer Theranostics. *Small* 2019;15(13):e1900205. DOI: 10.1002/smll.201900205.

Вклад авторов

И.В. Ярош: обзор публикаций по теме статьи и написание текста рукописи;
В.А. Мисюрин: разработка дизайна исследования и редактирование рукописи;
И.И. Краснюк: анализ данных, оформление рукописи.

Authors contribution

I.V. Yarosh: reviewing of publications of the article's theme, article writing;
V.A. Misyurin: developing the research design and article editing;
I.I. Krasnyuk: data analysis, manuscript formatting.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.В. Ярош / I.V. Yarosh: <https://orcid.org/0000-0002-3347-9674>
В.А. Мисюрин / V.A. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0002-0762-5631>
И.И. Краснюк / I.I. Krasnyuk: <https://orcid.org/0000-0003-4382-7377>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declares no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.
Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 13.01.2021. Принята к публикации: 16.04.2021.
Article submitted: 13.01.2021. Accepted for publication: 16.04.2021.