

**Šifra projekta / Project code J1-4408**

**Ultrazvočna signalna pot z od kalcija odvisno pozitivno povratno zanko za aktivacijo himernega antigenskega receptorja za imunoterapijo raka**

**Ultrasound signaling path with calcium-dependent positive feedback loop for chimeric antigen receptor activation for cancer immunotherapy**

**Vodja projekta:**

*izr. prof. dr. Mojca Benčina*

### **1. VSEBINSKI OPIS PROJEKTA:**

Eden večjih izzivov terapije s celicami T s himernim antigenskim receptorjem (CAR-T) je varnost. Neinvaziven nadzor nad CAR T celicami je torej ključen za povečanje učinkovitosti in varnosti zdravljenja. Ultrazvok ima edinstveno prednost pred drugimi tehnologijami. Omogoča s prostorsko natančnostjo neinvaziven časovni nadzor nad celično aktivnostjo v globokem tkivu, kar bomo uporabili za neinvazivno aktivacijo načrtovanih terapevtskih naprav. Vrsta izzivov je povezana z ultrazvočno aktivacijo terapevtskih celic pri imunoterapiji raka; v tem projektu bomo naslovili dva izmed njih. Skrajšanje trajanja insonacije bomo dosegli z vključitvijo sintetične  $Ca^{2+}$  pozitivne povratne zanke, ki bo temeljila na  $Ca^{2+}$  izpustno aktiviranih  $Ca^{2+}$  kanalčkih ( $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  channels, CRAC), ki omogočajo dolgotrajno stimulacijo. Za izdelavo sintetičnega ojačevalnika  $Ca^{2+}$  signala bomo uporabili interakcije med STIM1 in Orai1. Za regulacijo izražanja avtolognih genov in CARa bomo ustvarili transkripcijske faktorje, ki bodo temeljili na DNA vezavni domeni iz CRISPR, ki omogočajo nadzor izražanja več genov naenkrat in bodo odzivni na ultrazvok. Za dokaz koncepta delovanja terapevtskih celic bomo zasledovali citotoksičnost in uničevanje tumorja s prostorsko in časovno odvisno neinvazivno ultrazvočno aktivacijo CAR-T celic. Opisana zasnova ultrazvočne imunomodulacije bo nudila edinstven pristop k raziskavam uporabe CAR-T proti trdnim tumorjem in bo služila kot učinkovito orodje za neinvazivno časovno in prostorsko aktivacijo genov. Akustogenetska kontrola aktivacije umetnih T celic bo omogočila razvoj varnejših celičnih terapij.

One of the biggest concerns of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy is safety. Noninvasive functional control of CAR T cells to enhance therapeutic and safety outcomes is therefore crucial. Ultrasound has a unique advantage in providing noninvasive temporal control of cellular activity in deep tissue with spatial precision. We will use exposure to ultrasound, insonation, for noninvasive temporal activation of an engineered therapeutic device. The focused ultrasound (FUS) activation of therapeutic cells in cancer immunotherapy presents several challenges; we aim to address two of them. A shortened insonation time will be achieved with the incorporation of a synthetic  $Ca^{2+}$  positive feedback loop based on  $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  channels (CRAC), which underline sustained  $Ca^{2+}$  signaling. Interaction between STIM1 and Orai1 will be exploited to build a synthetic  $Ca^{2+}$  signal amplifier. To regulate the expression of autologous genes and CARs, the US-responsive transcription factors based on the CRISPR DNA-binding domain, being able to regulate diverse genes, will be synthesized. For proof-of-concept, a spatiotemporal noninvasive activation of the US-responsive CAR T cells inducing cytotoxicity and tumor eradication will be tested. This ultrasound immunomodulation platform will provide a unique approach to precisely direct CAR-mediated anti-solid tumor activity and serve as an efficient tool for noninvasive spatiotemporal gene activation. Acoustogenetic control of the activation of engineered T cells may facilitate the design of safer cell therapies.

**Sodelujoče organizacije:**

- **EN-FIST CENTER ODLIČNOSTI**

#### **a. osnovni podatki glede financiranja:**

Projekt financira ARRS v okviru cenovne kategorije D za obdobje treh let v obsegu 1971 letnimi urami za obdobje 3 let. Pričetek financiranja je 1. 10. 2022.

The project is co-financed by ARRS with 1971 annual hours of price class D for a period of 3 years. Funding starts on October 1, 2022.

#### **b. sestava projektne skupine s povezavami na SICRIS**

Na Kemijskem inštitutu v projektni skupini sodelujejo / At the National Institute of Chemistry the project group includes:

Mojca Benčina; SICRIS št. 14360 <https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/8380>  
Vida Forstnerič; SICRIS št. 34529 <https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/39144>  
Duško Lainšček; SICRIS št. 34069 <https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/38518>  
Maja Meško; SICRIS št. 38257 <https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/44147>  
Tjaša Plaper; SICRIS št. 39111 <https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/45131>  
Arne Praznik; SICRIS št. 50616 <https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/46785>  
Anja Perčič; SICRIS št. 38275 <https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/44168>  
Eva Rajh; SICRIS št. 55264 <https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/51964>  
Erik Rihtar; SICRIS št. 53355 <https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/49797>  
Filip Ivanovski; SICRIS št. 54676 <https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/51323>  
Vid Jazbec; SICRIS št. 52001 <https://cris.cobiss.net/ecris/si/sl/researcher/48320>

#### **2. faze projekta in njihova realizacija**

Projekt sestavljajo štiri sklopi, ki sledijo zastavljenim ciljem.

WP1: Skrajšanje časa insonacije z uvedbo Ca<sup>2+</sup> pozitivne povratne zanke

WP2: Dekodiranje ultrazvočnega signala za aktivacijo nihanj citosolne koncentracije Ca<sup>2+</sup>

WP3: Načrtovanje signalne poti za uravnavanje transkripcije avtolognih genov z ultrazvokom

WP4: Predstavitev ultrazvočne prostorsko-časovne aktivacije izdelanih terapevtskih celic in implementacija v medicinsko pomembnih okoljih

The project consists of four scientific work packages in line with the set specific objectives.

WP1: Shortening insonation time by introducing Ca<sup>2+</sup> positive feedback loop

WP2: Decoding ultrasound signal to trigger different Ca<sup>2+</sup> oscillations

WP3: Design a signaling pathway to regulate the transcription of autologous genes triggered by ultrasound

WP4: Demonstration of ultrasound spatiotemporal activation of engineered therapeutic cells and implementation in medically relevant settings

#### **3. bibliografske reference, ki izhajajo neposredno iz izvajanja projekta**

#### **4. logotip ARRS in drugih sofinancerjev**



**ARRS**

JAVNA AGENCIJA ZA RAZISKOVALNO DEJAVNOST  
REPUBLIKE SLOVENIJE