

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И
КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ»

На правах рукописи



АЛСАЛЛУМ АЛАА

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ Т-
ЛИМФОЦИТОВ С ГЕНЕТИЧЕСКИ-МОДИФИЦИРОВАННЫМ Т-
КЛЕТОЧНЫМ РЕЦЕПТОРОМ, СПЕЦИФИЧНЫМ К АНТИГЕНУ NY-ESO-1**

3.2.7. Иммунология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Сенников Сергей Витальевич

Новосибирск, 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Иммунная система и опухолевый процесс.....	13
1.2. Активация Т-клеток: начальные взаимодействия.....	14
1.2.1. Активация Т-лимфоцитов: Комплекс TCR.....	15
1.2.2. Активация Т-лимфоцитов: рецептор CD28.....	17
1.2.3. Киллинг клетки-мишени.....	18
1.3. Преодоление киллинга клеток-мишеней.....	19
1.4. Дифференцировка и формирование подтипов Т-клеток.....	20
1.4.1. Фенотипические маркеры Т-клеток.....	22
1.5. Перенаправление специфичности Т-клеток с помощью генной инженерии.....	23
1.6. Стратегии получения генетически модифицированных Т-клеток, экспрессирующих антиген-специфичные TCR.....	26
1.7. NY-ESO-1 как высокоиммуногенный опухолевый антиген и перспективная мишень для TCR-Т-клеточной терапии.....	30
1.7.1. Иммуногенность NY-ESO-1 в контексте гуморального и клеточного иммунного ответа.....	31
1.7.2. Вакцинные платформы для активации NY-ESO-1-специфических Т-лимфоцитов.....	34
1.7.3. Генно-модифицированные Т-клетки с TCR, нацеленные на NY-ESO-1 в терапии злокачественных новообразований.....	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	44
2.1. Объект исследования.....	44
2.2. Доноры.....	45
2.3. Ретровирусный вектор.....	45
2.4. Получение NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитов.....	46
2.4.1. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови.....	46
2.4.2. Стимуляция пролиферации Т-клеток.....	46
2.4.3. Ретровирусная трансдукция МНК ПК, стимулированных антителами к CD3.....	47
2.5. Клеточные линии.....	47
2.6. Оценка эффективности трансдукции и фенотипирования NY-ESO-1-специфичных Т-лимфоцитов.....	49
2.6.1. Анализ данных проточной цитометрии.....	49
2.7. Оценка цитотоксической активности <i>in vitro</i>	50
2.8. Количественная оценка продукции цитокинов.....	51
2.9. Магнитная сортировка трансдуцированных Т-клеток для анализа экспрессии генов методом NanoString.....	51
2.10. Выделение тотальной РНК.....	52

2.11. Профилирование экспрессии генов методом Nanostring	52
2.12. Оценка противоопухолевой эффективности трансдуцированных Т-клеток в модели ксенотрансплантата клеток меланомы.....	53
2.13. Анализ экспрессии NY-ESO-1-специфичного TCR и выделение Т-лимфоцитов из модели ксенотрансплантата меланомы.....	54
2.14. Подготовка образцов для single-cell анализа на платформе BD Rhapsody.....	55
2.14.1. Подготовка cDNA библиотек и секвенирование	55
2.14.2. Обработка данных секвенирования.....	56
2.14.3. Контроль качества и анализ данных в Seurat	56
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	58
3.1. Получение NY-ESO-1-специфичных TCR-модифицированных Т-лимфоцитов.....	58
3.2. Фенотипическая характеристика NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитов: преобладание наивного фенотипа	59
3.3. Транскриптомный профиль NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитов	61
3.4. Антиген-специфическая цитотоксичность NY-ESO-1-специфичных TCR-модифицированных Т-лимфоцитов	69
3.5. Характеристика цитотоксических субпопуляций NY-ESO-1-специфичных CD8 ⁺ TCR-модифицированных Т-лимфоцитов	71
3.6. Анализ продукции цитокинов и цитотоксических молекул NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитов при взаимодействии с опухолевыми клетками	73
3.7. Противоопухолевая активность NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитов в модели ксенотрансплантата меланомы SK-MEL-37	74
3.8. Детекция NY-ESO-1-специфичных Т-лимфоцитов в периферической крови после инфузии в модели ксенотрансплантата меланомы	76
3.9. Одноклеточное транскриптомное профилирование NY-ESO-1-специфичных TCR-модифицированных Т-лимфоцитов в модели ксенотрансплантата меланомы	77
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	82
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	89
ВЫВОДЫ.....	92
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	96

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Злокачественные новообразования остаются одной из наиболее значимых глобальных проблем здравоохранения, характеризующихся ежегодным ростом показателей заболеваемости и смертности [1]. Несмотря на широкое применение традиционных методов лечения, таких как хирургическое вмешательство, лучевая и химиотерапия, их эффективность зачастую ограничена развитием резистентности и высокой токсичностью. Таким образом, значительная часть пациентов с метастатическими или рецидивирующими формами рака продолжает сталкиваться с неблагоприятным прогнозом [2, 3]. В связи с этим, в течение последнего десятилетия в онкологии отмечается существенный прогресс в разработке таргетных терапевтических подходов, обусловленный получением новых фундаментальных знаний о молекулярно-генетических и иммунологических механизмах развития злокачественных новообразований. Это, в свою очередь, способствовало становлению прецизионной медицины, характеризующейся более высокой специфичностью и меньшей токсичностью по сравнению с традиционными методами противоопухолевой терапии [4].

Иммунотерапия, занимающая особое место в лечении онкологических заболеваний, представляет собой перспективное направление, основанное на модуляции эффективности распознавания опухолевых клеток с целью повышения противоопухолевой активности клеток иммунной системы [5].

Перспективным направлением в области иммунотерапии опухолей является применение адаптивной клеточной терапии (АКТ), подразумевающей экспансию *ex vivo* опухолеинфильтрирующих Т-лимфоцитов (ТИЛ) или Т-лимфоцитов, стимулированных специфическими опухолевыми антигенами и цитокинами, до достижения необходимого количества с последующей реинфузией пациентам, предварительно подвергшимся лимфодеплеции. Данный подход позволяет в значительной степени компенсировать низкую иммуногенность так называемых «холодных» опухолей [6].

Применение технологий генной инженерии в АКТ открыло принципиально новые возможности для конструирования Т-клеток с заданными свойствами, что привело к разработке инновационных терапевтических подходов на основе двух основных стратегий: (1) химерных антигенных рецепторов (CAR) и (2) Т-клеточных рецепторов (TCR), специфичных к эпитопам опухолевых антигенов [7].

Ретровирусные векторы остаются одним из наиболее широко применяемых инструментов для внесения генетических конструкций как в доклинических, так и в клинических

исследованиях, благодаря своей высокой эффективности, обеспечивающей стабильную интеграцию и длительную экспрессию трансгенов в клетках-мишенях [8]. CAR-T-клеточная терапия основана на использовании одноцепочечных варибельных фрагментов антител (scFv), экспрессируемых на инженерном рецепторе, для распознавания поверхностных антигенов клеток-мишеней [9]. Несмотря на продемонстрированный значительный успех CAR-T-клеточной терапии при лечении гематологических злокачественных новообразований, ее применение в терапии солидных опухолей остается ограниченным в связи с ограниченной доступностью большинства внутриклеточных опухолевых антигенов [10]. В данном контексте, генетически модифицированная TCR-T-клеточная терапия представляет собой перспективную альтернативу, обеспечивая возможность точного распознавания внутриклеточных опухолевых антигенов, представленных молекулами главного комплекса гистосовместимости I класса (MHC-I), что делает низкомутационные неоантигены, экспрессируемые в опухолевых клетках, эффективными мишенями для иммунного воздействия. Данный подход позволяет получать большие популяции Т-лимфоцитов с высокой аффинностью к антигенным детерминантам, даже в условиях гетерогенной популяции Т-клеток [11].

В настоящее время семейство антигенов, известных как раково-тестикулярные антигены (cancer-testis antigens, CTAs), занимает доминирующее положение в TCR-основанной адоптивной клеточной иммунотерапии. Данные антигены характеризуются ограниченной экспрессией в иммунопривилегированных тканях, таких как яички и плацента, а также aberrантной реэкспрессией в опухолевых тканях [12].

Среди раково-тестикулярных антигенов особый интерес представляет белок NY-ESO-1 (New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma-1), название которого происходит от плоскоклеточной карциномы пищевода, выявленной у пациента из Нью-Йорка, в ткани которой данный антиген был впервые идентифицирован. NY-ESO-1 относится к опухолю-ассоциированным антигенам и характеризуется высокой иммуногенностью, обеспечивающей индукцию как гуморальных, так и клеточных иммунных ответов. При этом уровень антител к NY-ESO-1 коррелирует со стадией заболевания и его прогрессированием [13, 14]. Указанные свойства делают NY-ESO-1 перспективной молекулярной мишенью для разработки эффективных и высокоспецифичных иммунотерапевтических подходов с ограниченной внеопухолевой токсичностью, особенно на поздних стадиях онкологического процесса. В настоящее время разработан широкий спектр платформ, нацеленных на NY-ESO-1, включая белковые и пептидные вакцины, ДНК- и мРНК-вакцины, вирусные и бактериальные векторы, искусственные адъювантные векторные клетки (aAVC), а также вакцины на основе дендритных клеток [15]. Клинические испытания адоптивной клеточной терапии с использованием генетически модифицированных TCR-T-клеток при меланоме и синовиальной саркоме

продемонстрировали обнадеживающие показатели объективного ответа, достигающие 40–60 % [16, 17].

Тем не менее, сложное взаимодействие между Т-лимфоцитами и опухолевым микроокружением продолжает создавать серьезные трудности, что обуславливает необходимость дальнейшего совершенствования подходов для реализации полного терапевтического потенциала молекулярной мишени NY-ESO-1.

В последние годы значительный прогресс в изучении антиген-специфических Т-клеток стал возможен благодаря развитию методов анализа на уровне отдельных клеток, в частности секвенирования мРНК (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq). Эта технология предоставляет уникальные данные о фенотипических и функциональных состояниях Т-лимфоцитов, что способствует более полному раскрытию их роли в противоопухолевой иммунотерапии [18–20].

Таким образом, изучение фенотипических и функциональных характеристик антиген-специфических Т-лимфоцитов, в сочетании с детальным анализом изменений экспрессии генов, ассоциированных с опухолевыми клетками, в условиях *in vitro* и *in vivo*, в процессе активации и дифференцировки Т-клеток, позволит получить новые фундаментальные сведения о механизмах реализации естественного иммунологического потенциала ТCR-Т-клеток. Ожидается, что полученные результаты внесут существенный вклад в разработку перспективных терапевтических подходов на основе ТCR-Т-клеток, направленных на преодоление терапевтической резистентности солидных новообразований.

Степень разработанности темы исследования

Адоптивная Т-клеточная терапия с использованием генетически модифицированных Т-лимфоцитов является одним из наиболее интенсивно развивающихся направлений современной онкологии. Значительные успехи, достигнутые при лечении гематологических злокачественных новообразований, стимулировали активное развитие исследований в области терапии солидных опухолей. Среди мишеней для ТCR-Т-клеточной терапии ведущую роль играют раково-тестикулярные антигены, в частности высокоиммуногенный антиген NY-ESO-1.

Однако большинство существующих работ сосредоточено на оценке клинических исходов, тогда как фундаментальные аспекты, связанные с фенотипическими и функциональными характеристиками самих генетически модифицированных ТCR-Т-лимфоцитов, изучены недостаточно. Это ограничивает наше понимание механизмов их действия и мешает дальнейшему совершенствованию терапии. Представленная работа была посвящена решению указанных вопросов.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы является изучение фенотипических и функциональных характеристик Т-лимфоцитов с модифицированным TCR, специфичным к раково-тестикулярному антигену NY-ESO-1, и оценка их противоопухолевой эффективности в модели ксенотрансплантата клеток меланомы.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Получить генетически модифицированные TCR-Т-лимфоциты, специфичные к NY-ESO-1, путём ретровирусной трансдукции Т-клеток человека конструкцией, кодирующей $\alpha\beta$ -TCR, распознающий комплекс NY-ESO-1_{157–165} / HLA-A*02:01.
2. Охарактеризовать субпопуляционный состав полученных NY-ESO-1-специфичных TCR Т-клеток.
3. Проанализировать транскриптомный профиль NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитов при взаимодействии с NY-ESO-1-позитивной опухолевой клеточной линией с использованием платформы NanoString.
4. Оценить *in vitro* противоопухолевую активность, продукцию цитокинов, а также экспрессию маркеров активации и цитотоксичности NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитов при взаимодействии с клетками-мишенями.
5. Исследовать противоопухолевую эффективность NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитов в модели ксенотрансплантата клеток меланомы SK-Mel-37 у иммунодефицитных мышей NRG и провести их транскриптомную характеристику методом одноклеточного секвенирования РНК (scRNA-seq).

Научная новизна

Впервые проведена комплексная фенотипическая и транскриптомная характеристика TCR-модифицированных Т-лимфоцитов, специфичных к комплексу NY-ESO-1_{157–165}/HLA-A*02:01, с использованием оптимизированной конструкции TCR с усиленной аффинностью, включающей аминокислотные замены в CDR2-домене β -цепи (Gly50→Ala, Ala51→Glu).

Показано, что полученные NY-ESO-1-специфичные TCR-Т-клетки обладают фенотипом, сочетающим признаки наивных и терминально дифференцированных эффекторных клеток памяти (TE), а также высоким соотношением CD4⁺/CD8⁺ клеток, что обеспечивает их повышенный пролиферативный потенциал и способность к длительной персистенции *in vivo*.

Впервые выявлено, что при взаимодействии с NY-ESO-1⁺ опухолевыми клетками TCR-модифицированные Т-лимфоциты индуцируют транскриптомную перестройку в сторону

эффекторного фенотипа с активацией сигнального пути IFN- γ и снижением экспрессии генов, ассоциированных с регуляторными Т-клетками (Treg).

Выявлены молекулярные маркеры цитотоксической активности в противоопухолевом действии NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитов, что подтверждается повышенной экспрессией маркеров активации и дегрануляции (CD107a, FasL) на CD8⁺ Т-клетках, а также секрецией гранзимов, перфорина, цитокинов IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17 и растворимого Fas-лиганда (sFasL), при взаимодействии с опухолевыми клетками.

Продемонстрировано, что инфузия NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-клеток в модели ксенотрансплантата клеток меланомы SK-MEL-37 у иммунодефицитных мышей линии NRG приводит к полной регрессии опухоли.

Впервые с применением одноклеточного секвенирования РНК (scRNA-seq) исследовано функциональное состояние NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-клеток *in vivo* в модели ксенотрансплантата клеток меланомы

Выявлена субпопуляция терминально дифференцированных эффекторных CD8⁺ Т-клеток памяти с экспрессией генов, характерных для НК-клеток (*KLRK1*, *FCGR3A*, *NKG7*), что указывает на наличие комбинированного механизма противоопухолевого действия — TCR-зависимого (антиген-специфичного) и TCR-независимого (аналогичного НК-клеткам).

Впервые выявлена экспрессия генов ингибиторных рецепторов *KLRC1*, *KLRG1*, *CD300A*, *LAGE3* в NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитах, что открывает перспективы дальнейших исследований их роли и применения в сочетании с блокадой иммунных контрольных точек.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведённое исследование вносит существенный вклад в развитие подходов к TCR-модифицированной клеточной терапии. Полученные данные о фенотипических и функциональных свойствах TCR-модифицированных Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопу антигена NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅/HLA-A*02:01 с аминокислотными заменами Gly⁵⁰→Ala и Ala⁵¹→Glu в CDR2-домене β -цепи, расширяют понимание механизмов их противоопухолевой активности. Особый интерес представляет выявленная субпопуляция CD8⁺ ТЕ-клеток с экспрессией генов, характерных для НК-клеток, что свидетельствует о функциональной пластичности TCR-модифицированных Т-лимфоцитов и их способности реализовывать альтернативные механизмы противоопухолевого ответа, включая активацию врождённого иммунитета.

Практическая значимость исследования заключается в подтверждении высокой терапевтической эффективности изучаемой TCR-конструкции против NY-ESO-1-позитивных опухолей, что создаёт основу для дальнейших исследований и оптимизации протоколов TCR-терапии.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения клеточной терапии с использованием модифицированных рецепторов TCR, нацеленных на NY-ESO-1, в качестве потенциально эффективного метода лечения NY-ESO-1-позитивных опухолей.

Результаты исследования имеют ценность для разработки усовершенствованных протоколов TCR-клеточной терапии, основанных на сочетании с другими терапевтическими подходами, такими как блокада иммунных контрольных точек (например, KLRC1) и/или активация NK-рецепторов, с целью усиления противоопухолевого ответа и повышения эффективности лечения.

Важным результатом является выявление того, что NY-ESO-1-специфичный TCR индуцирует в CD4⁺ эффекторных Т-клетках памяти транскриптомный профиль, характерный для цитотоксических лимфоцитов. Это создаёт предпосылки для разработки новой терапевтической стратегии, основанной на целенаправленном получении МНС-I-реактивных цитотоксических CD4⁺ Т-лимфоцитов.

Методология и методы исследования

В настоящем исследовании были использованы методы, направленные на всестороннюю характеристику Т-лимфоцитов человека, экспрессирующих $\alpha\beta$ -TCR, специфичный к антигену NY-ESO-1_{157–165} в комплексе с молекулой HLA-A*02:01.

Первичные мононуклеарные клетки периферической крови (МНК ПК) выделялись из образцов, полученных от здоровых доноров. Активация Т-лимфоцитов осуществлялась с использованием антител против CD3 и интерлейкина-2 (IL-2), после чего проводилась генетическая модификация клеток ретровирусным вектором, экспрессирующим NY-ESO-1-специфичный TCR с аминокислотными заменами G50A и A51E (Gly⁵⁰→Ala и Ala⁵¹→Glu) в CDR2-домене β -цепи.

Для оценки эффективности трансдукции и верификации специфичности экспрессируемого TCR применялся тетрамер МНС, содержащий пептид NY-ESO-1_{157–165}, представленный молекулой HLA-A*02:01. Тетрамерный анализ на основе проточной цитометрии позволял точно определять долю клеток, экспрессирующих специфичный TCR к NY-ESO-1.

Фенотипическая характеристика TCR-модифицированных Т-лимфоцитов осуществлялась с использованием многоцветной проточной цитометрии, включая анализ экспрессии маркеров активации и цитотоксичности, а также продукции цитокинов методом мультиплексного анализа на микросферах LEGENDplex™

Цитотоксическая активность Т-клеток оценивалась при взаимодействии с опухолевыми клетками линий NW-Mel-38 и SK-Mel-37, экспрессирующих целевой антиген и NY-ESO-1-

негативной контрольной линией НСТ-116, с помощью определения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), выделяющейся из повреждённых клеток при лизисе.

Для анализа транскриптомного профиля использовалась платформа NanoString nCounter, которая позволила выявить экспрессию ключевых регуляторных и функциональных генов в TCR-модифицированных Т-лимфоцитах.

Оценка *in vivo* эффективности NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-клеток проводилась в модели ксенотрансплантата меланомы человека (SK-MEL-37) у иммунодефицитных мышей линии NRG. Через 14 дней после инфузии осуществлялся забор периферической крови, из которой выделяли циркулирующие трансдуцированные человеческие Т-лимфоциты. Эти клетки использовались для анализа транскриптомных изменений *in vivo* с применением технологии одноклеточного секвенирования РНК (scRNA-seq) на платформе BD Rhapsody.

Обработка и интерпретация данных осуществлялись в программной среде R с использованием специализированных пакетов, преимущественно Seurat. Для анализа применялись алгоритмы кластеризации и визуализации (UMAP, HSNE), а также анализ дифференциальной экспрессии и обогащения сигнальных путей с использованием GSEA (Gene Set Enrichment Analysis).

Положения, выносимые на защиту

1. Т-клетки, трансдуцированные $\alpha\beta$ -TCR, специфичным к комплексу NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅/HLA-A*02:01, проявляют антиген-специфическую цитотоксическую активность в отношении NY-ESO-1-позитивных опухолевых клеток, сопровождающуюся активацией генов сигнального пути IFN- γ , повышением экспрессии маркера дегрануляции CD107a и лиганда FasL, а также секрецией цитотоксических молекул — гранзимов, гранулизина, перфорины, цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17) и растворимого Fas-лиганда (sFasL).

2. Терминально дифференцированные эффекторные CD8⁺ Т-клетки памяти и CD4⁺ эффекторные Т-клетки памяти, несущие TCR к NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅/HLA-A*02:01, являются основными антиген-специфическими клетками, экспрессирующими цитотоксические молекулы в модели ксенотрансплантата клеток меланомы SK-Mel-37.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов диссертационного исследования обеспечивается использованием современных методов молекулярной биологии и иммунологии, полностью соответствующих поставленным целям и задачам работы. Применение аттестованного оборудования, проведение экспериментов с достаточной биологической и технической

выборкой, включая исследования на лабораторных животных, а также корректное применение статистических методов гарантируют воспроизводимость и точность данных.

Все основные научные положения и выводы подтверждаются экспериментальным материалом, представленным в виде таблиц, графиков и иллюстраций, что позволяет объективно оценивать результаты исследования. Проведён углублённый анализ данных, включающий сопоставление с актуальными научными публикациями, что подтверждает соответствие полученных данных современному уровню исследований в области.

Материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на:

1. Отчетных конференциях аспирантов и ординаторов НИИФКИ (г. Новосибирск, 2022, 2023, 2024).
2. II Международной конференции «Генетические технологии в трансляционной биомедицине» (г. Томск, 2023).
3. XI Международная конференция молодых ученых в рамках площадки открытых коммуникаций OPENBIO, секция специалистов фундаментальной медицины. (г. Новосибирск, Научоград Кольцово, 2024).

Внедрение результатов в практику

Основные результаты и выводы работы внедрены в учебный и научный процесс в НИИФКИ (лекции для ординаторов) и НГУ (курсы “Клеточные технологии в иммунотерапии” и “Клиническая иммунология”).

Публикации по теме исследования

По материалам диссертационного исследования опубликовано 4 научные статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования Российской Федерации для публикаций основных результатов диссертаций на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология, индексируемых в российских (РИНЦ) и международных (Scopus/Web of Science) базах данных.

Личный вклад автора

Автор участвовал в разработке дизайна экспериментов; все результаты, представленные в данной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии на базе лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ, за исключением разработки ретровирусных векторных конструкций, выполненной группой под руководством профессора Х. Шика (Медицинская школа Университета Мизэ, Япония), и экспериментов *in vivo*, проведённых сотрудниками SPF-вивария ИЦиГ СО РАН. Лично автором выполнено обобщение и интерпретация результатов, оформление рукописи диссертации и автореферата, а также подготовка публикаций.

Объем и структура диссертации

Диссертация выполнена в соответствии с требованиями ГОСТ Р 7.0.11–2011 и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных данных, заключения и выводов. Текст диссертации занимает 119 страниц, на которых размещены 23 рисунка и 6 таблиц. Прилагаемая библиография содержит 314 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Иммунная система и опухолевый процесс

Иммунная система представляет собой сложную сеть клеток и белков, скоординировано функционирующих для защиты организма от патогенных воздействий. Иммунную систему можно сопоставить с армией, обеспечивающей оборону организма от внешних угроз. Как и в армии, в иммунной системе имеются различные специализированные клеточные популяции, выполняющие свои уникальные защитные функции, подобно «родам войск». В частности, В- и Т-лимфоциты непрерывно циркулируют в кровотоке, лимфатической системе и тканях-мишенях, обеспечивая быстрый ответ на потенциальные опасности. Т-лимфоциты реализуют цитотоксический механизм, уничтожая инфицированные или аномальные клетки, в то время как В-лимфоциты после активации продуцируют специфические антитела, нацеленные на нейтрализацию и элиминацию чужеродных агентов. Кроме того, иммунная система постоянно сканирует клетки на наличие соматических мутаций. Однако, при онкогенезе механизмы иммунного надзора зачастую оказываются неспособными эффективно контролировать опухолевую прогрессию.

Процессы канцерогенеза и прогрессии опухоли, а также роль иммунной системы в подавлении рака стали объектом интенсивных исследований с конца XX века, что привело к формулировке гипотезы иммуноредактирования рака. Согласно этой гипотезе, онкогенез включает три фазы: элиминация, равновесие и ускользание. На стадии элиминации врожденный и адаптивный иммунитет совместно работают для выявления и уничтожения трансформированных опухолевых клеток до того, как они станут клинически обнаружимыми.

Тем не менее, некоторые опухолевые клетки могут избежать полного уничтожения и перейти в фазу равновесия, когда адаптивная иммунная система ограничивает их рост [21]. На стадии ускользания опухолевые клетки преодолевают иммунный контроль, становятся менее иммуногенными и начинают бесконтрольно расти, что ведет к развитию клинически выраженной опухоли [22]. Уход опухоли от иммунного надзора рассматривается как одна из характерных черт канцерогенеза [23].

CD8⁺ Т-лимфоциты, представляющие собой основной пул цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ), играют ключевую роль в элиминации опухолевых клеток. При этом цитотоксические свойства могут также проявляться у отдельных субпопуляций CD4⁺ Т-лимфоцитов, что отражено в ряде исследований, посвящённых феномену цитотоксических CD4⁺ клеток [24]. Активация CD8⁺ Т-клеток и формирование их противоопухолевой активности происходит в рамках

многоэтапного процесса, включающего захват, процессинг и презентацию опухолевых антигенов, прайминг и клональную экспансию специфических клонов, инфильтрацию опухолевой ткани и реализацию эффекторной функции. В этих этапах задействованы клетки врождённого иммунитета, в первую очередь дендритные клетки и клетки естественные киллеры, а также $CD4^+$ Т-клетки, участвующие в координации адаптивного иммунного ответа. После активации эффекторные ЦТЛ мигрируют в опухолевую ткань, где распознают и уничтожают опухолевые клетки [25, 26].

В условиях прогрессирования онкологического заболевания, ЦТЛ часто подвергаются дисфункции и истощению, что является следствием развития иммунной толерантности и супрессии иммунных реакций в опухолевой микросреде (ОМС). Опухолевые фибробласты (CAFs), макрофаги типа 2 (M2) и регуляторные Т-клетки (Tregs) создают иммунологические барьеры, которые препятствуют эффективной работе $CD8^+$ Т-клеток [27].

Количество ЦТЛ в ОМС является важным прогностическим маркером. Опухоли могут быть классифицированы по степени инфильтрации $CD8^+$ Т-клетками и состава опухолевой микросреды. Опухоли с высокой инфильтрацией активных Т-лимфоцитов, особенно $CD8^+$ Т-клетки, называют «горячими», а опухоли с низким уровнем инфильтрации Т-клетками — «холодными», что является типичным фенотипом сопротивления, наблюдаемым во всех солидных опухолях [28].

Экзогенное реактивирование и/или прайминг Т-клеток $CD8^+$ представляют собой перспективные стратегии для преодоления опухолевого сопротивления и восстановления иммунного ответа на уничтожение раковых клеток.

1.2. Активация Т-клеток: начальные взаимодействия

$CD8^+$ Т-лимфоциты взаимодействуют с молекулами главного комплекса гистосовместимости класса I (МНС-I) на поверхности антигенпредставляющих клеток (АПК) и клеток-мишеней. На этих клетках экспонируются фрагменты антигенных пептидов, образованные в результате протеасомной деградации цитоплазматических белков и загруженные в пептидсвязывающие бороздки МНС-I [29, 30]. МНС–антиген–пептидные комплексы распознаются $CD8^+$ клетками, которые при взаимодействии с АПК или клеткой-мишенью прикрепляются к ней и сканируют ее поверхность путем ползания. Непосредственный контакт и движения клеток преобразуют механическую энергию в биомеханические сигналы, играющие важную роль в активации рецепторного комплекса $CD8^+$ Т-лимфоцитов (TCR, T-cell receptor) [31]. Мигрируя в направлении градиентов хемокинов и интегринов на АПК или клетках-

мишенях, активированные $CD8^+$ Т-лимфоциты формируют иммунологические синапсы между своим супрамолекулярным активационным комплексом и молекулами адгезии (например, межклеточной молекулой адгезии) на поверхности клетки-мишени [32]. Для подтверждения природы мишени TCR связывается с представленным пептидом, а CD8, как корецептор, взаимодействует с α -субъединицей МНС. Затем, после активации TCR, должен быть получен ко-стимулирующий сигнал от корецептора CD28, прежде чем будут активированы механизмы киллинга [33].

Клетки $CD4^+$ Т-хелперы обеспечивают помощь в активации (прайминге) $CD8^+$ Т-лимфоцитов. Дифференцировка $CD4^+$ Т-лимфоцитов в антигенспецифичные эффекторные клетки индуцируется дендритными клетками (ДК). Стимулирующее действие $CD4^+$ Т-лимфоцитов на прайминг $CD8^+$ Т-лимфоцитов опосредуется секрецией цитокинов [34]. $CD4^+$ Т-лимфоциты взаимодействуют с антигенами в контексте молекул МНС класса II. Это взаимодействие приводит к секреции цитокинов, стимулирующих $CD8^+$ Т-лимфоциты, что способствует их оптимальной пролиферации и активации [35]. $CD4^+$ Т-лимфоциты также способствуют созреванию ДК, необходимому для экспрессии ко-стимулирующих молекул и секреции цитокинов, участвующих в прайминге $CD8^+$ Т-лимфоцитов [36]. Аналогичную функцию выполняют и NK-клетки [37, 38]. Кроме того, взаимодействие NK-клеток и ДК стимулирует высвобождение цитокинов $CD4^+$ Т-клетками [38]. После активации эффекторные $CD8^+$ Т-лимфоциты мигрируют в опухолевую ткань для реализации противоопухолевого эффекта.

1.2.1. Активация Т-лимфоцитов: Комплекс TCR

Комплекс TCR — это сложная структура, агрегация которой представляет собой высокоорганизованный процесс. TCR состоит из антигенсвязывающей субъединицы ($TCR\alpha\beta$), нековалентно связанной с тремя сигнальными субъединицами корецептора CD3 ($CD3\zeta\zeta$, $CD3\delta\epsilon$ и $CD3\gamma\epsilon$) (Рисунок 1.1). Полипептиды CD3 γ , δ , ϵ и ζ содержат иммунорецепторные тирозин-активационные мотивы (ITAM) в цитоплазматических доменах, необходимые для экспрессии TCR на клеточной поверхности, внутриклеточной сборки и передачи сигнала [39]. Цепи $TCR\alpha$ и β включают переменный иммуноглобулиноподобный домен (V-домен), определяющий специфичность к антигену, константный домен (C-домен), мембраносвязывающий пептид, трансмембранный участок и короткий цитоплазматический хвост, не содержащий внутриклеточных сигнальных мотивов. Внутриклеточная передача сигнала осуществляется комплексом CD3, но для ее инициации и усиления требуется CD8 (Рисунок 1.1). CD45 — один

из наиболее распространенных гликопротеинов на поверхности Т-клеток. Он является положительным регулятором сигналинга TCR, дефосфорилируя (и тем самым активируя) киназу Lck через свой внутриклеточный тирозинфосфатазный домен; Lck, в свою очередь, фосфорилирует CD3 и ζ -цепи [40], индуцируя нисходящий сигналинг. Взаимодействие TCR $\alpha\beta$ с антигенным пептидом, представленным молекулой MHC класса I на поверхности клетки-мишени, приводит к фосфорилированию ITAM в цитоплазматических доменах сигнальных субъединиц [41]. CD8, присутствующий на поверхности Т-клетки в виде корецептора — $\alpha\alpha$ -гомодимера или $\alpha\beta$ -гетеродимера, связывается с комплексом TCR–MHC-I, обеспечивая прочную фиксацию комплекса TCR–CD3 к комплексу MHC–пептид и повышая чувствительность к комплексам пептид–MHC в 100 раз [42].

Серийное триггирование TCR играет ключевую роль в активации Т-лимфоцитов. Одиночный комплекс пептид–MHC на поверхности антиген-презентирующей клетки способен последовательно активировать до 200 TCR на Т-лимфоците, что позволяет даже небольшому количеству комплексов пептид–MHC эффективно инициировать активацию клетки [43]. Сигнал, исходящий от каждого активированного TCR, кратковременен и прекращается при отсутствии непрерывной активации. Продуктивное взаимодействие TCR с лигандом приводит к интернализации и деградации рецептора, что в свою очередь регулирует сигнальный процесс. Накопление транзиторных сигнальных событий со временем способствует достижению порогового уровня активации Т-лимфоцитов [44].

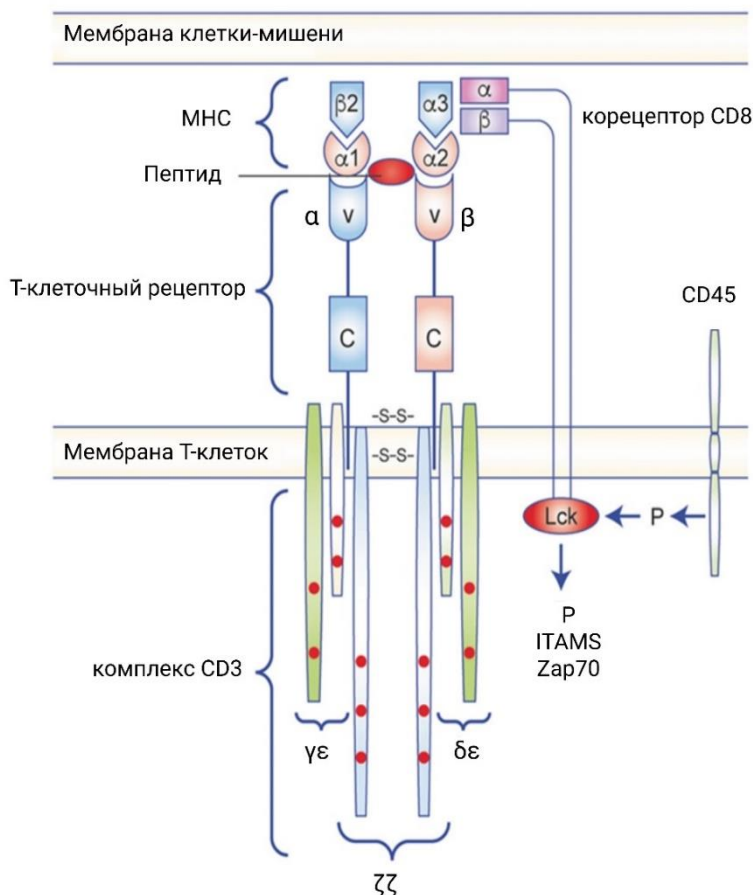


Рисунок 1.1 — Активация Т-лимфоцитов [25]. V-домены α - и β -цепей Т-лимфоцитов взаимодействуют с антигенным пептидом, представленным молекулами МНС-I на клетке-мишени. В то же время корецептор CD8 связывается с TCR–МНС-I для прочной фиксации комплекса TCR–CD3 к комплексу главного комплекса гистосовместимости (МНС) с пептидом. Когда CD8 связывается с МНС-I, Lck фосфорилирует внутриклеточные участки ITAM CD3, что обеспечивает позиционирование ZAP-70 для фосфорилирования трансмембранных белков, позволяющих CD8⁺ Т-лимфоцитам секретировать свои цитокины. Lck — лимфоцит-специфическая протеинтирозинкиназа, P — фосфорилирование, CD45 — рецептор-связанная протеинтирозинфосфатаза, Zap70 — ζ -цепь ассоциированной с рецептором Т-клеток протеинкиназы 70.

1.2.2. Активация Т-лимфоцитов: рецептор CD28

Как было описано выше, для полной активации Т-лимфоцитов, вслед за первоначальным активирующим сигналом от TCR, необходим независимый костимулирующий сигнал. Без этого

сигнала CD8⁺ Т-лимфоциты становятся анергичными и направляются в апоптоз. Этот второй сигнал опосредован взаимодействием рецепторов CD28 на CD8⁺ Т-лимфоцитах с CD80/B7.1 или CD86/B7.2, обильно экспрессируемых на АПК, макрофагах и активированных В-клетках, и играет ключевую роль в определении чувствительности CD8⁺ Т-лимфоцитов, снижая порог стимуляции наивных CD8⁺ Т-лимфоцитов и усиливая их пролиферацию и выработку цитокинов, в частности интерлейкина IL-2 [45].

Второй сигнал также защищает CD8⁺ Т-лимфоциты от ответа на собственные антигены, снижая тем самым риск повреждения тканей и развития аутоиммунитета. При активации рецептора CD28 фосфорилируются внутриклеточные тирозиновые остатки, что приводит к активации сигнальных каскадов MAPK (mitogen-activated protein kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase), PI3K–АКТ (phosphoinositide 3-kinase – protein kinase B) и ИКК (IκB kinase), а также к мобилизации внутриклеточного кальция. Это, в свою очередь, приводит к активации нескольких транскрипционных факторов, таких как NFAT (nuclear factor of activated T-cells), гетеродимера FOS–JUN (AP-1, activator protein 1) и NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), что в конечном итоге усиливает экспрессию антиапоптотического белка Bcl-xL и повышает выживаемость Т-лимфоцитов. В результате активируется механизм киллинга [46].

1.2.3. Киллинг клетки-мишени

Взаимодействие CD8⁺ Т-лимфоцитов с клетками-мишенями характеризуется устойчивой подвижностью CD8⁺ Т-лимфоцитов по отношению к клетке-мишени. Эти механические силы могут усиливать образование пор в мембране и последующий киллинг посредством секретируемых гранул, вызывающих киллинг, содержащих гранзимы, перфторин, катепсин С и гранулизин, сливающихся с мембраной клетки-мишени [47]. Альтернативно, комплекс гранулизина, перфорины и гранзимов поглощается клетками-мишенями посредством эндоцитоза мембран цитотоксических Т-лимфоцитов. Гранулизин и перфторин впоследствии создают поры в эндосомальной мембране и высвобождают несколько гранзимов в цитоплазму [48].

После секреции гранул белки, локализованные в лизосомах, такие как лизосомальные мембранные гликопротеины (LAMPs), LAMP-1 (CD107a) и LAMP-2 (CD107b), в большом количестве экспрессируются на поверхности Т-лимфоцитов [49].

Кроме того, Fas-лиганд (FASL) экспрессируется на CD8⁺ Т-лимфоцитах, и его связывание с Fas-рецепторами на клетках-мишенях активирует домены смерти (Fas-ассоциированный белок с доменами смерти [FADD]), которые, в свою очередь, активируют каспазы и эндонуклеазы, приводящие к фрагментации ДНК клеток-мишеней [50].

ЦТЛ также высвобождают интерферон- γ (IFN- γ) и фактор некроза опухоли α (TNF- α) для индукции цитотоксичности в клетках-мишенях [51].

1.3. Преодоление киллинга клеток-мишеней

Лизис клеток-мишеней может происходить в течение нескольких минут. Отдельные CD8⁺ Т-лимфоциты обладают способностью к серийному или одновременному киллингу множественных клеток-мишеней [52]. Однако опухолевые клетки развивают механизмы ускользания от иммунного надзора, включая снижение экспрессии молекул МНС I класса и секрецию ферментов, деградирующих перфорин, что, в частности, продемонстрировано на клетках меланомы [53]. С другой стороны, чрезмерная активация CD8⁺ Т-лимфоцитов может приводить к развитию нежелательных эффектов, таких как повреждение тканей и аутоиммунные реакции [54]. Для поддержания иммунологической толерантности и предотвращения неконтролируемой активации иммунной системы, CD8⁺ Т-лимфоциты, транзиторно экспрессируют ингибиторные рецепторы, известные как контрольные точки иммунного ответа (чекпойнты). Эти механизмы позволяют тонко регулировать иммунный ответ в условиях интенсивной антигенной стимуляции [55]. Однако, злокачественные новообразования могут использовать данные сигнальные пути для индукции иммуносупрессивного микроокружения, благоприятствующего их выживанию [56].

Длительное антигенное стимулирование CD8⁺ Т-лимфоцитов опухолевыми неоантигенами может вызывать устойчивую экспрессию молекул иммунных контрольных точек, что является характерной чертой и, возможно, способствует развитию дисфункционального состояния, называемого истощением Т-лимфоцитов, при котором простое устранение антигенного стимула не приводит к восстановлению функциональной активности лимфоцитов [57]. Ключевой особенностью истощенных Т-лимфоцитов является кумулятивное накопление ингибиторных рецепторов, характеризующееся последовательной экспрессией ингибиторных молекул: начиная с PD-1 и прогрессируя к экспрессии LAG-3 и VISTA на поздних стадиях дифференцировки [58]. Кроме того, на ранних этапах приобретения программы дисфункции истощенные CD8⁺ Т-лимфоциты сохраняют митотическую активность и способствуют формированию или поддержанию иммуносупрессивного микроокружения [59]. Понимание этих механизмов привело к разработке ингибиторов контрольных точек – моноклональных антител, нацеленных на ингибиторные рецепторы иммунной системы, которые стали огромным прорывом в иммуноонкологии и значительно улучшили клинические исходы при ряде онкологических

заболеваний, повышая эффективность противоопухолевого иммунного ответа и восстанавливая функциональную активность истощенных CD8⁺ Т-клеток [60].

Таким образом, дифференцировка CD8⁺ Т-лимфоцитов представляет собой строго регулируемый процесс, в котором характер, контекст и продолжительность антигенной стимуляции определяют траекторию развития Т-клеток – от функциональных эффекторных форм до гипореактивных состояний.

1.4. Дифференцировка и формирование подтипов Т-клеток

После прохождения положительной и отрицательной селекции в тимусе Т-клетки выходят в периферическое кровообращение в виде зрелых наивных Т-клеток (TN), обладающих строго определенной эпитопной специфичностью. В физиологических условиях эти клетки преимущественно пребывают в состоянии покоя, локализуясь в лимфатических узлах, где обеспечивается их длительная выживаемость и сохранение иммунного потенциала [61].

Активация наивных CD8⁺ Т-клеток происходит при взаимодействии с антигенпрезентирующими клетками и сопровождается глубокой перестройкой их протеома и метаболических процессов, необходимых для перехода в пролиферативно-активное состояние. В результате стимуляции Т-клетки вступают в фазу экспансии, характеризующуюся интенсивной пролиферацией и значительным увеличением численности антиген-специфических клонов. Средний период удвоения клеточной популяции составляет 6–8 часов, однако отдельные исследования демонстрируют пиковые значения, достигающие 4,5 и даже 2 часов [62, 63].

По мере экспоненциального увеличения численности популяции CD8⁺ Т-клеток происходит дифференцировка клеток в два основных эффекторных фенотипа. Первый – это кратковременно живущие эффекторные клетки (SLEC), отличающиеся высокой цитотоксической активностью, но подверженные апоптозу на стадии угасания иммунного ответа. Второй – клетки-предшественники памяти (MPEC), сохраняющиеся после элиминации антигена и обладающие способностью к дальнейшей дифференцировке в различные подтипы клеток памяти. В отличие от наивных Т-клеток, клетки памяти характеризуются более высоким порогом активации, однако при повторном контакте с антигеном демонстрируют ускоренный пролиферативный ответ, обеспечивая тем самым развитие более эффективного вторичного иммунного ответа [64].

Популяция CD8⁺ Т-клеток памяти характеризуется гетерогенностью, включающей циркулирующие формы (TCIRC), такие как клетки центральной памяти (TCM), эффекторные клетки памяти (TEM), Т-клетки памяти со свойствами стволовых клеток (TSCM) и терминально

дифференцированные клетки памяти (ТТЕ). Дополнительно, выделяют резидентные клетки памяти (ТТМ), которые персистируют в периферических тканях и обеспечивают локальный иммунный ответ [65–67].

Ключевым нерешённым вопросом остаётся то, на каком этапе — в процессе прайминга или уже после него — происходит окончательное решение о судьбе Т-клетки, что приводит к её дифференцировке в эффекторную клетку или клетку памяти. Существуют две основные гипотезы, объясняющие этот процесс.

Согласно линейной модели дифференцировки, клетки памяти формируются из наивных Т-клеток постепенно, проходя последовательные стадии: эффекторные Т-клетки, ТЕМ и ТСМ [68]. В рамках этой концепции окончательное закрепление статуса памяти происходит на стадии угасания иммунного ответа.

В отличие от этого, модель прогрессивной дифференцировки утверждает, что судьба Т-клетки определяется уже на ранних этапах иммунного ответа. В ходе прайминга наивные $CD8^+$ Т-клетки получают стимулы различной интенсивности, зависящие от аффинности ТСР к комплексу МНС/пептид, концентрации антигена, доступности ко-стимулирующих молекул и уровня цитокиновой стимуляции. Сильный интегрированный сигнал прайминга способствует дифференцировке в сторону эффекторных клеток, тогда как более слабый сигнал обуславливает формирование менее дифференцированных клеток, например ТСМ. Согласно этой модели, формирование «истинные» клетки памяти может начинаться уже на ранних стадиях иммунного ответа [69–71].

В рамках прогрессивной модели также была выдвинута гипотеза асимметричного деления, согласно которой дифференцировка Т-клеток начинается уже в процессе первого клеточного деления. Наивные Т-клетки, активированные антигеном, делятся асимметрично, что приводит к неравномерному распределению внутриклеточных компонентов между дочерними клетками. Клетки, расположенные ближе к зоне контакта с антигенпрезентирующей клеткой, дифференцируются в короткоживущие эффекторные клетки, тогда как более удалённые клетки формируют предшественников клеток памяти [72].

Тем не менее, фенотипические, функциональные и генетические характеристики этих подтипов Т-клеток [73, 74] свидетельствуют о том, что дифференцировка Т-клеток памяти человека происходит по линейной прогрессии вдоль континуума основных кластеров (ТН → ТSCM → ТСМ → ТЕМ → ТТЕ), где менее дифференцированные клетки дают начало более зрелым клеткам в ответ на антигенную стимуляцию или, возможно, гомеостатическое сигнализирование [75].

1.4.1. Фенотипические маркеры Т-клеток

Наивные Т-лимфоциты, циркулируя в кровотоке, рекрутируются в лимфатические узлы, где взаимодействуют с высокоэндотелиальными венулами посредством молекулы адгезии CD62L (L-селектина). Это взаимодействие способствует активации хемокинового рецептора CCR7, который связывается со своим лигандом CCL21 (SLC), экспрессируемым эндотелиальными клетками. В результате активируются интегрины, что обеспечивает прочную адгезию Т-лимфоцитов и их последующую трансэндотелиальную миграцию в лимфоидные органы [76–78].

В отличие от наивных Т-клеток, клетки памяти и эффекторные клетки преимущественно мигрируют через периферические ткани [79]. Этот процесс регулируется экспрессией различных интегринов и хемокиновых рецепторов [80, 81]. Однако часть клеток памяти рекрутируется обратно в лимфатические узлы, чтобы инициировать вторичный пролиферативный ответ.

Гетерогенность клеток памяти впервые была описана Саллусто, Ланцавеккья и их коллегами на основании экспрессии рецептора CCR7 и CD45RA [82]. Они выделили четыре субпопуляции Т-клеток: наивные клетки (TN, CD45RA⁺ CCR7⁺), центральные клетки памяти (TCM, CD45RA⁻ CCR7⁺), эффекторные клетки памяти (TEM, CD45RA⁻ CCR7⁻) и терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки (TTE, CD45RA⁺ CCR7⁻).

Кроме того, было установлено, что TCM-клетки продуцируют больше интерлейкина-2 (IL-2), чем TEM-клетки, которые, в свою очередь, синтезируют больше эффекторных цитокинов. На основании этих данных была предложена модель дифференцировки, согласно которой TCM-клетки являются промежуточной стадией на пути дифференцировки наивных Т-клеток в TEM-клетки в периферических тканях [71]. Однако эффекторные функции не ограничиваются исключительно TEM-клетками: как TCM, так и TEM-клетки продуцируют эффекторные цитокины в ответ на вирусные и антигенные стимулы [83–86], при этом TCM-клетки обладают более высокой пролиферативной способностью [87].

В дальнейшем были выявлены Т-клетки памяти со свойствами стволовых клеток (TSCM) — еще одна популяция, обладающая свойствами как наивных, так и клеток памяти. Эти клетки имеют высокий потенциал выживания и демонстрируют высокую эффективность при трансплантации в аллогенных моделях. У человека TSCM-клетки фенотипически напоминают наивные Т-клетки (CD45RA⁺ CD45RO⁻), однако также экспрессируют маркеры памяти, включая CD95 (FAS), CD122 (IL-2R β), IL-7R α (CD127), CD27, CD28, CCR7 и CD62L [74, 88]. Они обладают высокой пролиферативной активностью, способны к самообновлению и могут

дифференцироваться в другие подтипы клеток памяти, включая ТСМ и ТЕМ, что подтверждает их «стволовую» природу.

Интерлейкин-7 (IL-7) играет ключевую роль в выживании как наивных, так и памяти CD8⁺ Т-клеток [89]. Экспрессия KLRG1 в сочетании с CD127 (IL-7R α) позволяет дифференцировать короткоживущие эффекторные клетки (SLEC, CD127⁻/KLRG1⁺) от клеток-предшественников памяти (MPEC, CD127⁺/KLRG1⁻) [90]. Однако, несмотря на способность CD127 поддерживать выживание эффекторных CD8⁺ Т-клеток, его экспрессия и сигналы IL-7 недостаточны для формирования полноценного пула клеток памяти. Исследования показали, что принудительная экспрессия CD127 не предотвращает апоптоз клеток с высоким уровнем KLRG1 [91].

Терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки (TEFF) представляют собой последнюю стадию дифференцировки Т-лимфоцитов, которую можно обнаружить в периферической крови. Эти клетки характеризуются экспрессией CD95, CD122, KLRG1, а также ряда хоминг-рецепторов, таких как CCR5 и LFA-1, что способствует их миграции в воспаленные ткани. Эти клетки также реэкспрессируют CD45RA [92, 93]. Однако TEFF-клетки не экспрессируют CD45RO, CCR7, CD62L, IL-7R α (CD127), CD27 и CD28. Обладая высокой цитотоксической активностью, TEFF-клетки демонстрируют ограниченный пролиферативный потенциал, быстро истощаются и подвергаются апоптозу [94, 95].

Пионерские исследования начала 2000-х годов привели к открытию новой популяции клеток памяти — резидентных Т-клеток памяти (TRM), которые изначально рассматривались как циркулирующие ТЕМ-клетки [96]. Однако дальнейшие исследования показали, что TRM-клетки представляют собой уникальную популяцию, находящуюся исключительно в тканях. Их характерными маркерами являются интегрины CD103 и CD49a, которые способствуют удержанию клеток в тканях, а также CD69, предотвращающий выход TRM-клеток обратно в кровотоки [97].

1.5. Перенаправление специфичности Т-клеток с помощью генной инженерии

В последние десятилетия прогресс в изучении механизмов иммунного ответа способствовал развитию адаптивной клеточной терапии (АКТ), которая стала одной из наиболее перспективных стратегий лечения злокачественных новообразований. Одним из ключевых этапов развития АКТ стал успех терапии опухолеинфильтрирующими лимфоцитами (ТИЛ) при метастатической меланоме в 1980-х годах [98]. В отличие от Т-клеток периферической крови, ТИЛ содержат клоны, специфичные к опухолевым антигенам (клон – группа Т-клеток с идентичными TCR и специфичностью к одному и тому же антигену). При ТИЛ-терапии

аутологичные лимфоциты извлекаются из опухоли, подвергаются *ex vivo* экспансии и реинфузируются пациенту. Тем не менее, разработка и стандартизация TIL-препаратов по-прежнему представляют собой сложную задачу.

Следовательно, стратегии адоптивной клеточной терапии (АКТ) сместились в сторону генетической модификации Т-лимфоцитов периферической крови с использованием рецепторов, обеспечивающих антиген-специфическое распознавание. Основными подходами в данном направлении являются CAR-Т-клеточная терапия — применение Т-клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы (CAR, от англ. *chimeric antigen receptor*) — и TCR-Т-клеточная терапия.

В TCR-Т-клеточной терапии Т-клетки генетически модифицируются для экспрессии α - и β -цепей TCR, определяющих специфичность к определенному антигену. Введенные цепи TCR димеризуются и связываются с эндогенными компонентами CD3, формируя функциональный TCR-комплекс, перенаправляющий специфичность Т-клетки на целевой антиген [99]. Каждая цепь TCR содержит три гипервариабельных участка, известных как комплементарно-определяющие регионы (CDR1–3), которые формируются из генов V, D и J. CDR3, наиболее вариабельный регион, непосредственно контактирует с пептидным антигеном, определяя тонкую специфичность TCR. В отличие от этого, CDR1 и CDR2 взаимодействуют с молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC I и MHC II), обеспечивая базовый уровень аффинности TCR к молекулам MHC посредством консервативных взаимодействий [100].

Аффинность количественно определяется с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR), который измеряет динамику связывания посредством скорости ассоциации (K_{on}) и скорости диссоциации (K_{off}). Эти параметры совместно определяют константу диссоциации (KD), где $KD = K_{off}/K_{on}$ [101].

Для повышения эффективности TCR-Т-клеточной терапии используются высокоаффинные TCR, полученные путем направленной модификации аминокислотной последовательности в комплементарно-определяющие регионы (CDR2). Этот процесс повышает аффинность связывания TCR, преодолевая естественную низкую аффинность TCR, в том числе TCR, нацеленных на собственные или опухолевые антигены, что обусловлено процессами негативной селекции в иммунной системе [102–104].

Другим подходом является генетическая модификация Т-клеток с использованием CAR. CAR-рецепторы состоят из внеклеточного антигенсвязывающего домена, соединенного с внутриклеточным сигнальным доменом, который активирует Т-клетку при связывании с антигеном. Чаще всего антиген-связывающий домен получают из одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv, single-chain variable fragment) антитела. В стандартной CAR-конструкции scFv соединен линкерным регионом с трансмембранным доменом, который, в свою

очередь, связан с внутриклеточным сигнальным доменом CD3 ζ , запускающим активацию Т-клеток. Современные поколения CAR-рецепторов содержат дополнительные ко-стимулирующие внутриклеточные домены, такие как CD28 и 4-1BB, что способствует усилению функциональности и персистенции Т-клеток [105].

Принципиальное различие между TCR и CAR заключается в механизме распознавания антигена. TCR специфичны к пептидным антигенам, презентированным в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC/HLA), тогда как CAR взаимодействуют непосредственно с нативными поверхностными антигенами клеток-мишеней. Это ключевое отличие позволяет CAR-Т-клеткам преодолевать ограничения, связанные с HLA-рестрикцией, характерные для TCR-Т-клеточной терапии

Гены HLA отличаются исключительным полиморфизмом: на сегодняшний день описано свыше 20 000 аллелей HLA класса I [106]. В связи с этим, пациенты, отобранные для TCR-Т-клеточной терапии, должны экспрессировать не только целевой антиген, но и соответствующую HLA-аллель, ограничивающую его презентацию. Поэтому в TCR-Т-клеточной терапии обычно используются TCR, специфичные к наиболее распространенным HLA-аллелям, таким как HLA-A*02:01, присутствующему у 47,8% европейцев и 16,8% афроамериканцев в США [107].

Однако, CAR-рецепторы ограничены в распознавании исключительно поверхностных антигенов опухолевых клеток, в то время как TCR взаимодействуют с пептидами, презентуемыми HLA, происходящими из широкого спектра внутриклеточных белков. Учитывая, что трансмембранные белки составляют лишь 14–26% от общего протеома клетки [108–110], спектр потенциальных мишеней для CAR-Т-терапии существенно сужается.

Помимо принципиальных различий в HLA-рестрикции, TCR и CAR различаются по организации сигнальных комплексов и структуре иммунологического синапса, несмотря на то, что изначально разрабатывались для имитации сигнальной активности TCR. Эти различия определяют их дифференциальную чувствительность к антигену и, как следствие, функциональные особенности при антигенной стимуляции: TCR способны инициировать цитотоксический ответ при связывании с относительно небольшим количеством комплексов пептид-MHC (pMHC). В отличие от них, CAR-рецепторам для запуска эффективного ответа требуется присутствие тысяч молекул мишени на поверхности клетки [99, 111–113].

Следствием сниженной чувствительности CAR к антигену является феномен рецидива у пациентов с В-клеточными опухолями: после начального ответа на CAR-Т-терапию у них развивается прогрессирующий рецидив с потерей экспрессии антигена [114].

Другой особенностью CAR-рецепторов является их способность вызывать сверхфизиологическую активацию Т-клеток при стимуляции, что приводит к усиленной продукции цитокинов. Как следствие, CAR-Т-клетки чаще вызывают синдром высвобождения

цитокинов (CRS) по сравнению с TCR-T-клетками. Однако, благодаря последним достижениям в области терапии, CRS в большинстве случаев удается эффективно контролировать клинически [115].

Крайне важным аспектом разработки эффективных стратегий клеточной терапии является выбор антигена-мишени, позволяющего минимизировать потенциальную токсичность. Экспрессия целевого антигена на здоровых клетках может приводить к развитию нежелательных явлений, известных как “on-target off-tumor” токсичность обусловленной лизисом нормальных тканей, экспрессирующих данный антиген. В контексте CD19-специфичной CAR-T терапии В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний, данная токсичность, связанная с повреждением нормальных В-лимфоцитов, может быть частично компенсирована посредством заместительной терапии иммуноглобулинами. Однако, в большинстве случаев солидных опухолей, компенсация повреждения здоровых тканей представляется невозможной, что предъявляет повышенные требования к специфичности антигена-мишени.

В настоящее время, значительная часть высокоспецифичных опухолевых антигенов представлена внутриклеточными белками, доступными для распознавания посредством TCR, но недоступными для CAR-опосредованного нацеливания [116]. Таким образом, TCR-T-клеточная терапия потенциально обладает преимуществом в возможности эффективного воздействия на опухолевые клетки при одновременной минимизации токсичности, что особенно актуально в контексте терапии солидных опухолей.

1.6. Стратегии получения генетически модифицированных Т-клеток, экспрессирующих антиген-специфичные TCR

В процессе развития тимоцитов, посредством V(D)J-рекомбинации, генерируется чрезвычайно разнообразный репертуар Т-клеточных рецепторов (TCR), определяющий спектр распознаваемых антигенов. У взрослого человека популяция циркулирующих Т-лимфоцитов составляет приблизительно 4×10^{11} , при этом уникальных Т-клеточных клонов — около 10^{10} . Каждый клон представлен Т-клетками, экспрессирующими идентичные TCR и, следовательно, обладающими специфичностью к одному и тому же антигену [117].

Однако большинство клонов, в особенности тех, которые специфичны к невирусным антигенам, присутствуют в периферической крови в крайне незначительных количествах, что затрудняет их выделение и последующее изучение. Для решения данной проблемы применяются различные методы обогащения Т-клеток, направленные на селективное увеличение доли антиген-специфичных лимфоцитов в исследуемой популяции, что является необходимым этапом

для идентификации последовательностей TCR и последующей трансгенной экспрессии с целью получения популяций Т-лимфоцитов с заданными характеристиками антигенной специфичности. Обогащение может быть осуществлено с использованием инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TILs) [118–121], либо Т-клеток, полученных из периферической крови пациентов, вакцинированных противоопухолевыми антигенами [122]. Альтернативно используется *in vitro* стимуляция Т-лимфоцитов с помощью аутологичных антиген-презентирующих клеток (чаще всего дендритных), нагруженных пептидами или нуклеиновыми кислотами, кодирующими интересующие антигены [123]. В последнее время активное распространение получили «искусственные» антиген-презентирующие клетки (иАПК). Распространенным вариантом иАПК является использование клеточной линии миелоидного лейкоза K562, негативной по HLA-A, B и DR. Данная клеточная линия служит платформой для создания модульных иАПК путем стабильной трансдукции различных аллелей HLA и костимуляторных молекул. Разработаны также бесклеточные системы иАПК, в которых молекулы HLA и костимуляторные лиганды конъюгированы с микросферами или наночастицами [124, 125].

После обогащения популяции Т-лимфоцитов, следующий важнейший этап — это идентификация клонов, экспрессирующих антиген-специфичные TCR. Классическим подходом служит стимуляция Т-клеток антигеном с последующей оценкой экспрессии маркеров активации (CD69, 4-1BB) [126, 127], или продукции ключевых цитокинов, таких как IFN- γ [120]. Однако с внедрением молекулярных методов специфической детекции Т-лимфоцитов [128], МНС-пептидные мультимеры стали «золотым стандартом» для анализа и манипуляций с Т-клетками, компенсируя низкую аффинность взаимодействия мономерных комплексов МНС-эпитопов с TCR [129]. Наиболее широко применяется технология МНС-тетрамеров, позволяющая детектировать и количественно оценивать антиген-специфические CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетки с помощью проточной цитометрии [130, 131]. Тетрамеры состоят из четырёх биотинилированных субъединиц МНС, связанных с флуоресцентно-меченым стрептавидином, что позволяет достичь высокой avidности за счёт одновременного взаимодействия с несколькими TCR на поверхности Т-клетки (Рисунок 1.2), обеспечивая высокую чувствительность при детекции и изоляции редких антиген-специфичных Т-клеток [132–135]. Исследования показали, что связывание TCR и CD8 с тетрамерами рМНС I индуцирует паттерны тирозинового фосфорилирования, аналогичные тем, что наблюдаются при взаимодействии с АПК [136–139]. Для минимизации активации Т-клеток были разработаны модифицированные формы МНС-I (CD8-null тетрамеры), содержащие мутации в $\alpha 3$ -домене молекул МНС I, что препятствует взаимодействию с корцептором CD8, сохраняя при этом возможность специфического окрашивания [140–142].

Последующим этапом является определение последовательностей α - и β -цепей TCR, что осуществляется с использованием методов высокопроизводительного секвенирования [143]. Полученные данные служат основой для создания Т-клеток с трансгенной экспрессией заданных рецепторов.

Генетическая модификация аутологичных Т-лимфоцитов с целью экспрессии антиген-специфичных TCR реализуется как с применением вирусных векторов (ретро- и лентивирусных), так и с использованием невирусных систем — таких как транспозонные системы PiggyBac и Sleeping Beauty или методы редактирования генома (TALEN, CRISPR/Cas9) [144–147]. В рамках клинических и доклинических исследований ретровирусные и лентивирусные векторы используются наиболее часто. Ретровирус-опосредованный перенос генов (трандукция) позволяет получить популяции высокоактивных, опухоль-специфичных Т-клеток за короткие сроки. Интеграционно-компетентные гамма-ретровирусные векторы обеспечивают стабильную экспрессию CAR или TCR в Т-клетках, способствуя формированию долговременного иммунного ответа [148]. Этот подход позволяет эффективно анализировать и сопоставлять различные антигенные рецепторы [149, 150]. Клинические исследования подтверждают безопасность данного подхода — не зарегистрировано случаев образования репликационно-компетентных вирусов или трансформации Т-клеток у пациентов терапии [151].

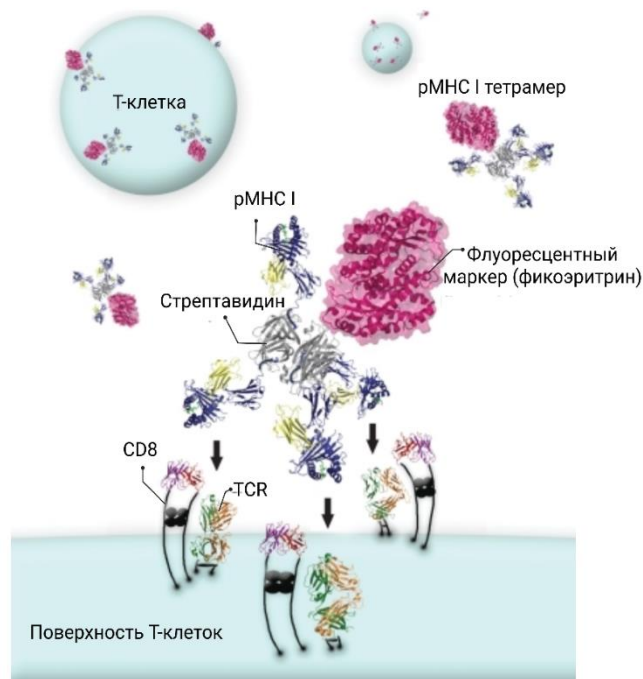


Рисунок 1.2 — Схематическое изображение пептид-МНС I (pMHC I) тетрамерного комплекса, используемого для идентификации антиген-специфических цитотоксических Т-клеток. Стрептавидин-биотин-пептид-МНС I (pMHC I) взаимодействует с Т-клеточными рецепторами (TCR) и рецептором CD8 на поверхности клетки [140].

Оценка функциональной активности TCR-модифицированных Т-клеток осуществляется с использованием многопараметрической проточной цитометрии, позволяющей анализировать их активационные и цитотоксические свойства после специфического распознавания антигена. Анализируются фосфорилирование сигнальных молекул [152], продукция цитокинов, экспрессия цитолитических белков, транслокация маркеров дегрануляции [153–156]. Цитотоксические CD8⁺ Т-лимфоциты содержат в цитоплазме преформированные лизосомальные гранулы, готовые к дегрануляции при активации. Эти гранулы покрыты белками, такими как CD107a — маркером дегрануляции, который временно экспрессируется на поверхности клетки после высвобождения гранул [157, 158]. Внутри гранул находятся цитолитические белки (перфорин и гранулизин) и ферменты (гранзимы В, А), которые обеспечивают разрушение клеток-мишеней. [159]. Кроме того, ЦТЛ экспрессируют молекулы FasL и TRAIL (апоптотический лиганд, индуцирующий гибель клеток), взаимодействие которых с соответствующими рецепторами на клетках-мишенях запускает сигнальные пути апоптоза [160].

Для прямой оценки цитотоксичности традиционно используется ⁵¹Cr-релизный тест, основанный на измерении выхода радиоактивного хрома из разрушенных клеток-мишеней [161]. Однако в связи с использованием радиоактивных реагентов и сопутствующими ограничениями были разработаны альтернативные методы, включая имидж-цитометрию [162], биолюминесцентные и флуоресцентные подходы [163, 164], а также анализ высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ), обладающий рядом преимуществ: он не требует метки клеток-мишеней и не зависит от проницаемости мембран. [165–167]

Современные молекулярные технологии, такие как NanoString и одноклеточное секвенирование РНК (scRNA-seq), расширяют возможности анализа Т-клеток. Технология scRNA-seq позволяет анализировать гетерогенность Т-клеточной популяции на уровне отдельных клеток, выявляя субпопуляции с различным функциональным статусом [18–20, 168]. Это, в свою очередь, способствует более глубокому пониманию процессов дифференцировки и функциональной специализации цитотоксических Т-лимфоцитов. Применение панели NanoString, включающей 579 иммунных и воспалительных генов, способствует анализу паттернов экспрессии и ключевых сигнальных путей, регулирующих активацию Т-клеток [169–171].

Комплексность описанного подхода — от обогащения и идентификации до экспрессии TCR и функциональной валидации — позволяет создавать популяции Т-клеток с заданной специфичностью и представляет собой основу для разработки высокоэффективных иммунологических терапий, направленных на точечное устранение патологически изменённых клеток.

1.7. NY-ESO-1 как высокоиммуногенный опухолевый антиген и перспективная мишень для TCR-T-клеточной терапии

Эффективность современных подходов к противоопухолевой иммунотерапии в значительной степени зависит от способности иммунной системы распознавать опухолевые клетки как чужеродные структуры и инициировать специфический и мощный иммунный ответ. Однако гетерогенность опухолей остаётся одним из ключевых барьеров, так как не все опухолевые клетки экспрессируют антигены, пригодные для иммунного нацеливания [172].

Опухолевые антигены можно условно подразделить на опухолеассоциированные (tumour-associated antigens, ТАА) и опухолеспецифические антигены (tumour-specific antigens, TSA). Они представляют собой молекулярные маркеры, позволяющие иммунной системе идентифицировать патологически трансформированные клетки [173]. Несмотря на это, экспрессия таких антигенов не всегда приводит к эффективной элиминации опухоли. Причинами этого являются вариабельность экспрессии антигенов, формирование иммунологической толерантности, а также наличие иммуносупрессивной микросреды, препятствующей полноценной активации эффекторных звеньев иммунного ответа [174].

Особый интерес представляет семейство раково-тестикулярных антигенов (cancer-testis antigens, СТА), кодируемое 276 генами, объединёнными более чем в 70 генетических семейств [175]. Эти антигены характеризуются ограниченной экспрессией в нормальных иммунопривилегированных тканях — яичках и плаценте, которые не экспрессируют молекулы МНС, а также стабильным присутствием в различных опухолях, что делает их перспективными мишенями для иммунного вмешательства [176].

Наиболее изученным представителем семейства СТА является антиген NY-ESO-1 (New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma 1, также обозначаемый как СТАG1B), кодируемый одноимённым геном, локализованным в области Xq28 X-хромосомы. Это белок массой 18 кДа, состоящий из 180 аминокислот, который отличается высокой иммуногенностью среди других СТА. Его N-концевая область богата глицином и содержит эпитопы, способные активировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ, тогда как C-концевая часть гидрофобна и включает консервативный домен Psc1, предположительно участвующий в регуляции клеточного цикла и пролиферации [177–180].

Экспрессия NY-ESO-1 в эмбриогенезе начинается на 13-й неделе в герминативных клетках яичек и яичников, достигая пика на 22–24 неделях с последующим резким спадом [181]. Во взрослом организме его экспрессия сохраняется только в сперматогониях и первичных сперматоцитах, отсутствуя в соматических тканях [182, 183]. Это обстоятельство имеет

принципиальное значение, поскольку позволяет избегать повреждения здоровых тканей при таргетной иммунотерапии, направленной против NY-ESO-1 [184].

В опухолях экспрессия NY-ESO-1 активируется посредством эпигенетических механизмов, включая участие мультибелковых комплексов HDAC1-mSin3A-NCOR1, Dnmt3b-HDAC1-Egr1 и Dnmt1-PCNA-UHRF1-G9a [185]. Применение деметилирующих препаратов, таких как декабицин (5-аза-2'-дезоксцитидин), в доклинических моделях приводило к увеличению экспрессии NY-ESO-1 в опухолевых клетках, активации иммунного ответа и снижению опухолевой массы, а также увеличению выживаемости у животных [186–188].

Наибольшая частота экспрессии NY-ESO-1 зафиксирована при миксоидной и круглоклеточной липосаркоме (89–100%), нейробластоме (82%), синовиальной саркоме (80%), меланоме (46%) и эпителиальном раке яичников (43%) [189–196]. Высокая экспрессия NY-ESO-1 в миксоидной липосаркоме делает его ценным дифференциально-диагностическим маркером: чувствительность достигает 84,4%, специфичность — 100%. Кроме того, наличие экспрессии антигена связано с неблагоприятным прогнозом и снижением общей выживаемости пациентов [197, 198]. В синовиальной саркоме NY-ESO-1 также применяется для дифференциальной диагностики с другими опухолями веретеноклеточного типа, где его экспрессия редка [199, 200]. Гомогенность экспрессии NY-ESO-1 в определённых опухолях делает их приоритетными кандидатами для иммунотерапии, основанной на антиген-специфичных Т-клетках. Эксперименты *in vitro* подтверждают чувствительность клеточных линий миксоидной липосаркомы к цитотоксичности NY-ESO-1-специфичных Т-клеток [196]. Предварительные клинические данные демонстрируют обнадеживающие результаты такой терапии у пациентов с NY-ESO-1-положительным раком яичников, меланомой и синовиальной саркомой [16, 201]. При этом нежелательные явления, наблюдаемые при терапии другими СТА, такими как MAGE-A3 (в частности, нейро- и кардиотоксичность вследствие перекрестной реактивности), не проявлялись, что свидетельствует о высоком профиле безопасности и специфичности [202, 203].

1.7.1. Имуногенность NY-ESO-1 в контексте гуморального и клеточного иммунного ответа

Открытие NY-ESO-1 как опухолевого антигена было обусловлено его способностью индуцировать выраженный гуморальный иммунный ответ у онкологических больных. Первые данные о спонтанной иммунной активности в отношении NY-ESO-1 были получены у пациента с диагнозом рак пищевода [178]. В дальнейшем, при скрининге 234 сывороток пациентов с различными формами злокачественных новообразований с использованием метода ИФА, было

установлено, что антитела к NY-ESO-1 выявляются приблизительно у 50 % пациентов с экспрессией данного антигена, что существенно превышает уровень серопозитивности, наблюдаемый при других опухолевых антигенах, таких как MAGE-1, MAGE-3 и SSX [14]. Выявлено, что титры антител к NY-ESO-1 коррелируют со стадией заболевания и опухолевой нагрузкой [37].

В исследовании с участием 363 больных раком желудка антитела к NY-ESO-1 выявлялись у 3,4% пациентов на I стадии, 4,4% — на II стадии, 25,3% — на III и 20,0% — на IV стадии заболевания. При этом у пациентов, перенесших хирургическое вмешательство без последующего рецидива, наблюдалось постепенное снижение уровня антител [204]. В масштабном исследовании Oshima и соавт. [205], включившем более 170 пациентов с раком пищевода, частота выявления сывороточных антител к NY-ESO-1 составила 32 %, что существенно превосходило аналогичные показатели при других солидных опухолях, включая рак лёгкого, печени, желудка, молочной железы и предстательной железы (таблица 1.1). У здоровых доноров антитела не выявлялись, что подчёркивает специфичность иммунного ответа. Также было установлено, что частота выявления антител к NY-ESO-1 при раке пищевода повышается по мере прогрессирования заболевания. Даже на I стадии уровень серопозитивности (16%) превышал показатели других биомаркеров — CEA, CYFRA 21-1 — и был сопоставим с уровнями SCC-Ag и p53 [206].

Таблица 1.1 — Частота выявления антител к NY-ESO-1 в сыворотке пациентов с различными типами рака (по данным Oshima и соавт.)

Тип опухоли	Количество пациентов	Антитела к NY-ESO-1 (%)
Рак пищевода	172	32.0%
Рак легких	269	12.3%
Гепатоцеллюлярная карцинома	91	12.1%
Рак желудка	313	10.5%
Колоректальный рак	262	8.4%
Рак молочной железы	365	7.1%
Рак простаты	358	10.3%
Здоровые доноры	74	0.0%

Кроме гуморального, NY-ESO-1 индуцирует и клеточный иммунный ответ. Одновременное наличие антител и CD8⁺ Т-клеточного ответа было впервые выявлено у пациента

с метастатической меланомой. Были идентифицированы три HLA-A2-рестриктивных эпитопа в пределах аминокислотных остатков 155–167, которые распознаются цитотоксическими Т-лимфоцитами: пептиды QLSLLMWIT (155–163), SLLMWITQC (157–165), и SLLMWITQCFL (157–167) [179]. Помимо CD8⁺, в ряде исследований были идентифицированы и CD4⁺ Т-лимфоциты, специфичные к HLA-DRB1*- и HLA-DP4-рестриктивным эпитопам белка NY-ESO-1 [207–212].

В попытке объяснить высокую иммуногенность NY-ESO-1, Zeng G и соавторы выдвинули гипотезу, согласно которой антиген, высвобождаясь из некротических клеток в опухолевом микроокружении, взаимодействует с рецепторами C1q и Toll-подобным рецептором 4 (TLR4) на поверхности незрелых ДК, инициируя фагоцитоз и созревание [213]. В результате зрелые ДК мигрируют в лимфатические узлы и представляют пептиды NY-ESO-1 Т-клеткам, инициируя адаптивный иммунный ответ (Рисунок 1.3). Это позволяет рассматривать NY-ESO-1 не только как ТАА, но и как эндогенный адъювант [214], соответствующий критериям повреждающего ассоциированного молекулярного паттерна (DAMP, damage-associated molecular patterns) [215]. Эта гипотеза была подтверждена в доклинической модели: вакцина, основанная на клетках опухоли Ренса, трансфицированных для экспрессии NY-ESO-1, вызывала более выраженное торможение роста опухоли и активацию ДК по сравнению с контрольными клетками, экспрессирующими зеленый флуоресцентный белок (GFP). При этом терапевтический эффект ослабевал у TLR4-нокаутных мышей, что подтверждает участие этого рецептора в активации иммунного ответа [216].

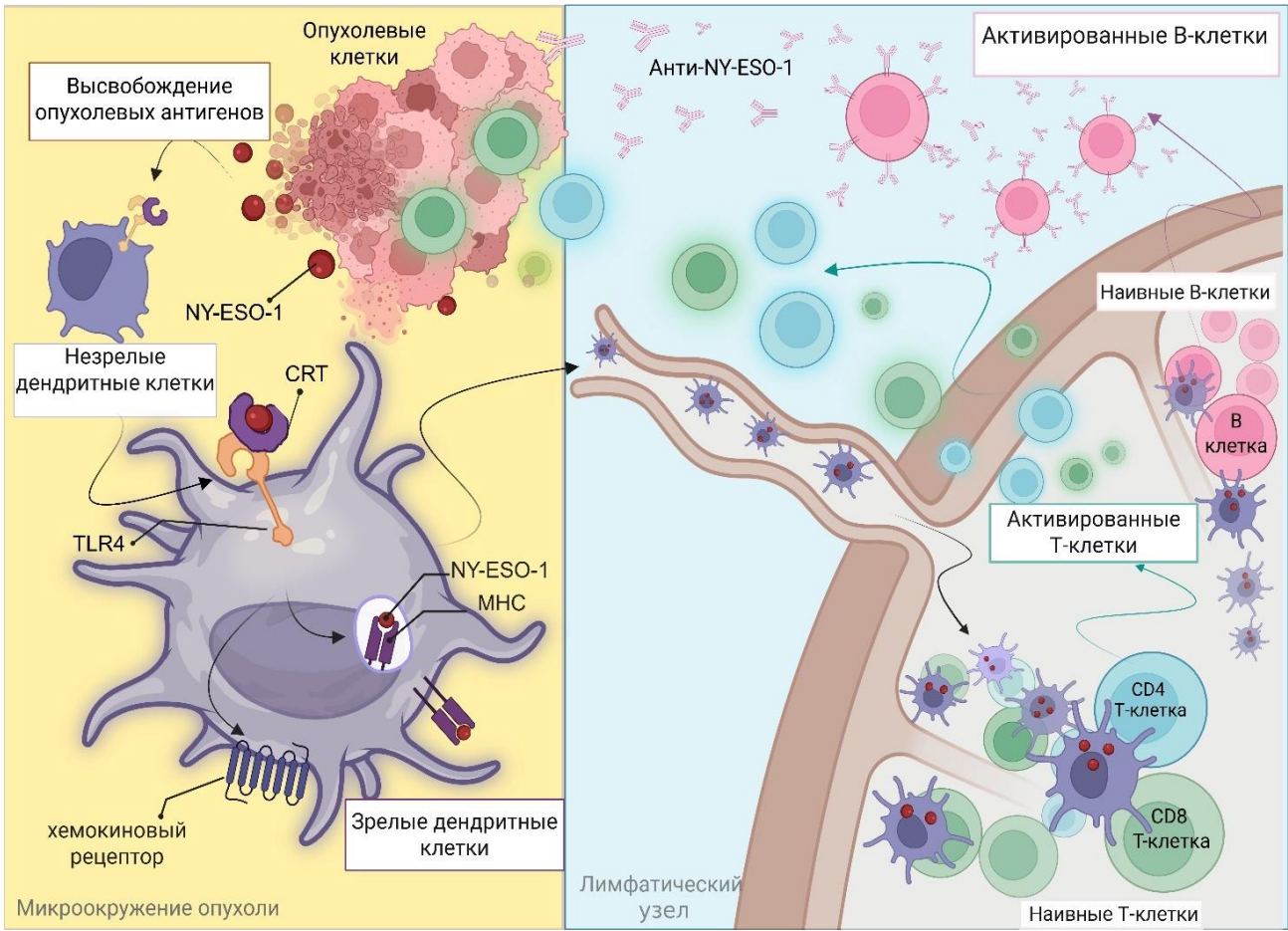


Рисунок 1.3 — Гипотетический механизм иммуногенности опухолеассоциированного антигена NY-ESO-1 в микросреде опухоли. Антиген NY-ESO-1, высвобождаемый при некрозе опухолевых клеток, взаимодействует с комплексом CRT–TLR4 на поверхности незрелых дендритных клеток. Калретикулин (CRT), не обладающий трансмембранным доменом, функционирует как кофактор, ассоциированный с TLR4. Связывание NY-ESO-1 с данным рецепторным комплексом инициирует фагоцитоз и индуцирует созревание дендритных клеток. В ответ на активацию зрелые ДК мигрируют в регионарные лимфатические узлы, где презентуют пептиды NY-ESO-1 Т-лимфоцитам, запуская каскад иммунных реакций и формируя спонтанный адаптивный ответ против опухоли [Разработана автором].

1.7.2. Вакцинные платформы для активации NY-ESO-1-специфических Т-лимфоцитов

Высокая иммуногенность и опухолевая специфичность антигена NY-ESO-1 определили его как одну из ключевых мишеней в разработке противоопухолевой иммунотерапии. На его

основе был создан широкий спектр вакцинных платформ, включая пептидные и белковые вакцины, нуклеиновые (ДНК- и мРНК-) вакцины, векторные системы на основе вирусов и бактерий, вакцины с дендритными клетками, а также искусственные адьювантные векторные клетки (aAVC, artificial adjuvant vector cells) (Рисунок 1.4) [15].

Несмотря на разнообразие платформ, целью всех указанных стратегий являлась индукция NY-ESO-1-специфического Т-клеточного ответа. В ряде клинических исследований зарегистрировано формирование как CD4⁺-, так и CD8⁺-ответов, сопровождающихся серопозитивностью и в отдельных случаях — объективными клиническими эффектами. Так, мРНК-вакцина BNT111 индуцировала стойкий CD8⁺-ответ и способствовала регрессии опухолей у пациентов с меланомой [217]. Вирусные платформы, использующие стратегию двухэтапной иммунизации («прайм-буст», prime-boost), например комбинация рекомбинантных вирусов rV-NY-ESO-1 и rF-NY-ESO-1, продемонстрировали улучшенное выживание у части пациентов с меланомой и овариальным раком [218, 219]. Конструкция на основе лентивируса (LV305), а также комбинированная схема SMB305, индуцировали NY-ESO-1-специфические Т-клетки, коррелирующие с увеличением общей выживаемости у пациентов с саркомами мягких тканей [220–222].

Тем не менее, эффективность индуцируемых вакциной цитотоксических лимфоцитов часто ограничивается низкой avidностью рецепторов, недостаточной персистенцией и неспособностью распознавать эндогенно процессированный антиген, что особенно характерно для синтетических пептидных вакцин. Индуцируемые ими Т-клеточные рецепторы (TCR) обладают структурными особенностями, отличающимися от тех, которые формируются в ходе естественного иммунного [223–225].

Указанные ограничения подчёркивают принципиальное препятствие для вакцинных стратегий в контексте лечения солидных опухолей, обладающих выраженными механизмами иммунного ускользания. В связи с этим возрастает интерес к подходам, способным преодолеть иммунные барьеры за счёт внедрения заранее отобранных, высокоавидных и опухолевых-специфичных Т-клеточных рецепторов. Одним из таких перспективных направлений является терапия на основе Т-клеток, экспрессирующих трансгенный TCR, специфичный к NY-ESO-1.

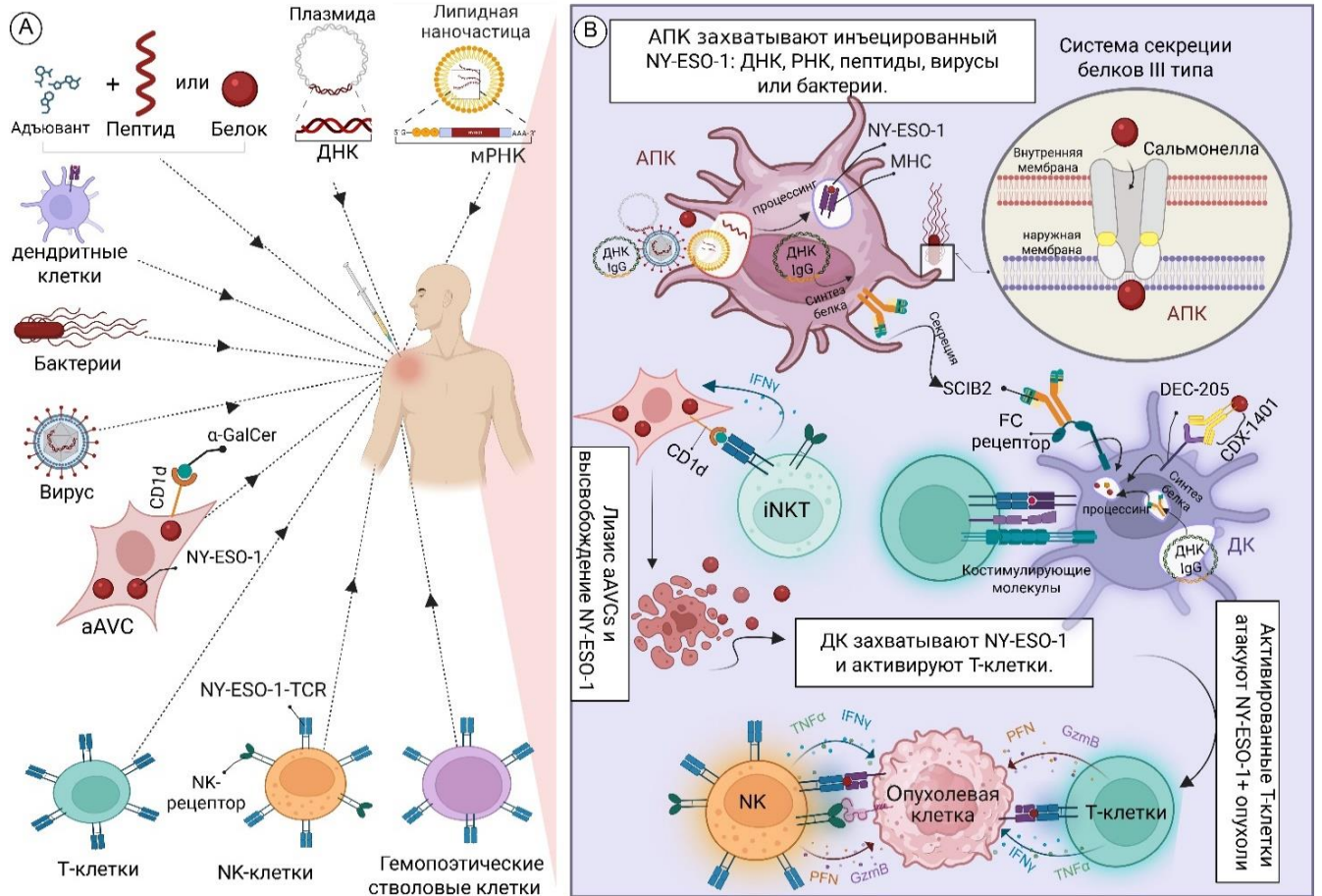


Рисунок 1.4 — Схематическое представление иммунотерапевтических стратегий, нацеленных на NY-ESO-1, и соответствующих механизмов их действия. (А) Современные платформы, разрабатываемые для иммунотерапии, включают различные подходы, такие как пептидные и рекомбинантные белковые вакцины, ДНК- и мРНК-вакцины, вакцины на основе дендритных клеток, вирусные и бактериальные векторные системы, искусственные адьювантные векторные клетки (aAVC), а также терапию с использованием Т-лимфоцитов, натуральных киллерных (NK) клеток и гемопоэтических стволовых клеток, экспрессирующих трансгенные TCR, применяемых в рамках адоптивной клеточной терапии. (Б) Антиген-презентирующие клетки (АПК) захватывают введенный NY-ESO-1, представленный в форме ДНК, мРНК, пептидов или в составе вирусных конструкций, и инициируют специфический Т-клеточный ответ за счёт активации CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов. При ДНК-вакцинации антиген может экспрессироваться в виде IgG-подобной молекулы (например, SCIB2), способной связываться с высокоаффинными Fc-рецепторами на поверхности дендритных клеток, что способствует кросс-презентации антигена. Кроме того, SCIB2 может быть напрямую представлен дендритными клетками. Другой подход представлен химерной конструкцией CDX-1401, содержащей опухолевый антиген NY-ESO-1 и моноклональное антитело к DEC-205 — рецептору на дендритных клетках, что

усиливает эффективность антигенной презентации. α AVC, экспрессирующие α -галактозилцерамид (α -GalCer) в комплексе с молекулой CD1d — MHC-I-подобной молекулой, участвующей в презентации липидных антигенов, —активируют инвариантные натуральные киллерные Т-клетки (iNKT), которые, распознавая и лизируя α AVC, способствуют высвобождению опухолеассоциированных антигенов и последующей активации дендритных клеток. Модифицированные штаммы *Salmonella typhimurium* обеспечивают доставку NY-ESO-1 в АПК посредством системы секреции III типа, облегчая транспортировку антигена в цитозоль. Терапия с использованием Т-лимфоцитов, экспрессирующих трансгенный TCR, позволяет селективно распознавать и уничтожать опухолевые клетки, экспрессирующие NY-ESO-1. Следует также отметить, что модифицированные NK-клетки, сохраняя собственный рецепторный репертуар, проявляют противоопухолевую активность посредством TCR-независимых механизмов цитотоксичности [Разработана автором].

1.7.3. Генно-модифицированные Т-клетки с TCR, нацеленные на NY-ESO-1 в терапии злокачественных новообразований

Адоптивная Т-клеточная терапия занимает центральное место в современной онкоиммунологии, предполагая использование собственного иммунного арсенала пациента для борьбы с опухолевыми клетками. В одном из клинических наблюдений инфузия аутологичных CD4⁺ Т-клеток, *in vitro* сенсibilизированных к эпитопу NY-ESO-1 (157–170) в контексте HLA-DR*04, привела к стойкой ремиссии, длившейся до двух лет. Эти клетки персистировали в периферической крови пациента не менее трёх месяцев даже без поддерживающей терапии цитокинами, и были ассоциированы с развитием эндогенных иммунных ответов на другие меланомные антигены [226]. Однако ограниченная доступность опухолеспецифичных инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) при солидных опухолях стимулировала развитие альтернативной тактики — генерации Т-клеток, модифицированных ретро- и лентивирусными векторами, кодирующими TCR, специфичный к NY-ESO-1. Впервые Robbins с соавторами провели клиническое исследование, в котором использовали генетически модифицированные Т-лимфоциты, экспрессирующие Т-клеточный рецептор (TCR), специфичный к эпитопу SLLMWITQC (157–165), представленному в контексте HLA-A*02:01. При лечении пациентов с метастатической меланомой и синовиальной саркомой в рамках этого клинического исследования была зафиксирована частота объективных ответов на терапию в 45% и 67% соответственно. Однако длительность клинического эффекта не во всех случаях коррелировала с персистенцией инфузировавшихся Т-лимфоцитов [16].

В последующем расширенном исследовании (NCT00670748) аналогичный подход продемонстрировал частоту объективных ответов на терапию в 61% у пациентов с синовиальной саркомой и в 55% у пациентов с меланомой. При этом показатели общей выживаемости через 3 и 5 лет составили 38% и 14% для саркомы и 33% для меланомы [17].

Потенциал применения NY-ESO-1-специфичных TCR-модифицированных Т-клеток (так называемых SPEAR Т-клеток) изучался также в рамках протоколов NCT01343043 и NCT01352286. В указанных исследованиях использовалась конструкция NY-ESO-1^{e259} (LETE-cel) — аффинитетно улучшенный TCR, направленный на тот же эпитоп SLLMWITQC в контексте HLA-A*02:01. У пациентов с синовиальной саркомой частота клинических ответов варьировала от 20% до 50%, что зависело от используемой лимфодеплетирующей схемы и уровня экспрессии NY-ESO-1 в опухоли [227]. В ряде случаев зафиксирована длительная персистенция Т-клеток с фенотипом памяти, что рассматривается как потенциально положительный прогностический фактор. Тем не менее, в отдельных наблюдениях отмечались случаи развития аутоиммунных осложнений, включая синдром Гийена–Барре, что потребовало назначения терапии иммуноглобулинами [228].

Дополнительные данные были получены в исследовании NCT01352286 с включением пациентов с множественной миеломой. Согласно предварительным результатам, SPEAR Т-клетки демонстрировали способность к миграции в костный мозг, длительной персистенции и сохранению функциональной активности. Частота объективных ответов достигала 80%, медиана безрецидивной выживаемости составляла 1,5 года сохранения [229, 230].

В другом исследовании (NCT03250325) была протестирована конструкция TCR, распознающая эпитоп SLLMWITQC в контексте HLA-A02:01 и HLA-A02:06. В исследуемой когорте пациентов частота объективных ответов составила 50%, медиана общей выживаемости — 650 дней. У 50% пациентов был зафиксирован синдром высвобождения цитокинов (CRS), успешно контролируемый стандартной терапией; признаков нейротоксичности не отмечено [231, 232]. Краткое описание дизайна и результатов клинических исследований TCR-продуктов, направленных на NY-ESO-1, приведено в таблице 1.2.

Современные исследования в области таргетинга NY-ESO-1 сопровождаются активным поиском способов повышения её эффективности и устойчивости к опухолевым механизмам иммунного ускользания [233]. Одним из таких подходов является индукция антигенного спрединга, при котором разрушение опухоли высвобождает новые антигены, усиливая эндогенный Т-клеточный ответ. Данная стратегия реализуется, в том числе, путём сочетания TCR-терапии с лимфоузло-направленными вакцинами, содержащими амфифильные пептиды [234–238] или наногели, как было продемонстрировано в клиническом исследовании JMA-ПА00346. В одном из случаев у пациента наблюдалось устойчивое сокращение опухолевой массы

на протяжении более двух лет, что сопровождалось длительной персистенцией инфузированных Т-клеток [239, 240]. Такой подход позволяет активировать как эндогенные, так и трансдуцированные Т-клетки, формируя каскад вторичных иммунных ответов.

Для повышения эффективности терапии в условиях иммуносупрессивного микроокружения, в частности обусловленного действием трансформирующего фактора роста бета (TGF- β), были разработаны Т-клеточные продукты нового поколения (NCT02650986), коэкспрессирующие NY-ESO-1-специфичный TCR и доминант-негативный рецептор TGF- β RII (dnTGF- β RII), блокирующий передачу сигнала и тем самым предотвращающий угнетение активности Т-клеток [241].

Дополнительно в рамках мультикогортного клинического исследования II фазы (NCT04526509), досрочно завершённого из-за пересмотра исследовательских приоритетов компании GSK, оценивались три модифицированных варианта TCR-Т-клеток: — GSK3901961, характеризующийся коэкспрессией CD8 α с целью повышения чувствительности Т-клеток к антигену; — GSK3845097, включающий доминант-негативный рецептор TGF- β RII (dnTGF- β RII), который блокирует супрессорный сигнальный путь TGF- β ; — GSK4427296, созданный с использованием технологии эпигенетической репрограммировки (Epi-R) для поддержания стволоподобного фенотипа Т-клеток и усиления их пролиферативного потенциала.

С учётом необходимости разработки универсальных стандартизированных клеточных продуктов, пригодных для масштабного и немедленного применения (так называемых "off-the-shelf" решений), ранее предпринимались попытки клинической апробации генно-модифицированных аутологичных гемопоэтических стволовых клеток, способных обеспечивать устойчивую продукцию NY-ESO-1-специфичных Т-лимфоцитов *in vivo* (исследование NCT03691376, завершено досрочно).

Альтернативно, продолжается развитие стратегий, основанных на использовании НК-клеток, не требующих МНС-сопоставления и обладающих низким риском развития реакции "трансплантат против хозяина" [242, 243]. В частности, в исследовании NCT06066359 (набор участников продолжается) изучается эффективность НК-клеток, модифицированных конструкцией, включающей TCR, специфичный к NY-ESO-1, и IL-15, обеспечивающий их поддержание и функциональную активность [244].

Обобщая данные литературы, можно заключить, что успешная реализация TCR-опосредованной терапии злокачественных новообразований, особенно солидных опухолей, требует преодоления ряда существенных биологических барьеров — ограниченной инфильтрации Т-клеток в опухолевую ткань, иммуносупрессивного воздействия опухолевого микроокружения, а также гетерогенности экспрессии опухолеассоциированных антигенов. На фоне обнадеживающих результатов клинических исследований, направленных на использование

TCR-модифицированных Т-клеток, специфичных к NY-ESO-1, особую значимость приобретает комплексное исследование их фенотипических и транскрипционных характеристик, включая экспрессию маркеров памяти, истощения, контрольных точек, активации и цитотоксической активности. Анализ функционального состояния таких клеток как *in vitro*, так и *in vivo* позволяет глубже понять механизмы, определяющие их противоопухолевую активность. Полученные знания могут быть использованы для оптимизации TCR-клеточных продуктов и повышения их клинической эффективности в терапии NY-ESO-1-позитивных солидных опухолей.

Таблица 1.2 — Основные клинические исследования терапии TCR-модифицированными T-клетками, нацеленными на антиген NY-ESO-1 [Разработана автором]

Исследование (NCT)/ Фаза	Подход	Конструкция TCR/ Вектор	Мишень (пептид / HLA)	Тип опухоли	Результаты (n = число пациентов)
NCT00670748/II [17]	Аутологичные T-клетки с TCR, специфичным к NY-ESO-1; вакцина ALVAC NY-ESO-1; циклофосфамид; флударабин	1G4- α 95:LY Модификация CDR3 α -цепи/ Ретровирус	SLLMWITQC / HLA-A*0201	Меланома, Синовиальная саркома	Синовиальная саркома (n = 18): <ul style="list-style-type: none"> • OCR – 61%; • 3-летняя OS – 38%; • 5-летняя OS – 14%. Меланома (n = 20): <ul style="list-style-type: none"> • OCR – 55%; • 3-летняя OS – 33%; • 5-летняя OS – 33%.
NCT03250325/ I-II [231, 232]	TBI-1301: T-клетки с TCR (MS3II-TCR NY-ESO-1-siTCR); циклофосфамид	G50A+A51E в CDR2 β -цепи + siRNA подавление эндогенного TCR/ Ретровирус	SLLMWITQC / HLA-A*0201, *0206	Синовиальная саркома	(n = 8): <ul style="list-style-type: none"> • ORR – 50%; • медиана OS – 650 дней; • CRS – 50% (1 пациент – степень 1; 3 пациента – степень 2); • нежелательные явления – 87,5% • (все купированы стандартной терапией).
JMA-IIA00346/ II [240]	TBI-1301 + CHP:NE1 (пулуановый наногель с NY-ESO-1 и CpG-адьювантом K3)			Продвинутая саркома мягких тканей	(n=3): <ul style="list-style-type: none"> • У одного пациента наблюдалось уменьшение опухоли >2 лет с длительной персистенцией TCR-клеток; • У другого – снижение размеров опухоли после инфузии; • 2 случая CRS (степени 1 и 2)

Исследование (NCT)/ Фаза	Подход	Конструкция TCR/ Вектор	Мишень (пептид / HLA)	Тип опухоли	Результаты (n = число пациентов)
NCT01343043/ I [227]	NY-ESO-1 SPEAR Т-клетки; флударабин; циклофосфамид	NY-ESO-1c259 (lete-cel): Аффинно- модифицирова нный TCR/ Лентивирус	SLLMWITQC / HLA-A*0201	Синовиальная саркома	(n=12): <ul style="list-style-type: none"> • ORR – 50%; • CR – 1; • PR – 5; • PFS – 15 нед.; • OS – 120 нед.; • CRS – у 5 пациентов (медиана – 10 дней). • Персистенция TCR (n=7): до 200 дней; • Преобладание TSCM и TCM подтипов
NCT01352286/ I-II [229, 230]	NY-ESO-1 SPEAR Т-клетки после аутологичной трансплантации стволовых клеток			Множественная миелома	(n = 25): <ul style="list-style-type: none"> • ORR – 44%; • PFS – 52%; • очень хороший PR – 8; • PR – 1; строгий CR – 1; • CR – 1; • PFS \geq13,5 мес. – у 3 пациентов; • медиана OS – 35,1 мес.

Примечание: CR — полный ответ (англ. complete response); PR — частичный ответ (partial response); CRS — синдром высвобождения цитокинов (англ. cytokine release syndrome); OCR — частота объективного клинического ответа (англ. objective clinical response); ORR — общая частота ответа (англ. overall response rate); OS — общая выживаемость (англ. overall survival); PFS — выживаемость без прогрессирования заболевания (англ. progression-free survival); TSCM / TCM — Т-клетки памяти со свойствами стволовых клеток / Т-клетки центральной памяти; ALVAC NY-ESO-1 — рекомбинантная вирусная вакцина, экспрессирующая NY-ESO-1; siRNA — малые интерферирующие РНК (англ. small interfering RNA); G50A+A51E — аффинно-модифицированный TCR в CDR2 β -цепи с заменами аминокислот: глицин (G) \rightarrow аланин (A) в позиции 50 и аланин (A) \rightarrow глутаминовая кислота (E) в позиции 51; IG4- α 95:LY — аффинно-модифицированный TCR на основе исходного TCR 1G4 с заменой в CDR3 α -цепи на позиции 95

лейцин (L) заменён на тирозин (Y); CHP:NE1 — комплекс на основе наногеля pullulan с NY-ESO-1 и CpG-олигодезоксинуклеотидами; TBI-1301 — генетически модифицированные Т-клетки, трансдуцированные TCR, специфичным к NY-ESO-1; SPEAR T cells (specific peptide enhanced affinity receptor T cells) — Т-клетки с аффинно-модифицированным рецептором; LETE-cel (NY-ESO-1c259) — аффинно-модифицированный Т-клеточный рецептор на основе клона c259, нацеленный на пептид NY-ESO-1 в контексте HLA-A*02:01.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

Объектом исследования являлись генетически модифицированные Т-лимфоциты человека, экспрессирующие $\alpha\beta$ -TCR, специфичный к эпитопу опухоли-ассоциированного антигена NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ в комплексе с молекулой HLA-A*02:01 I класса. Предметом исследования явилось функциональное состояние NY-ESO-1-специфичных TCR-T-лимфоцитов и экспрессия цитотоксических молекул и цитокинов в условиях противоопухолевого ответа *in vitro* и *in vivo*.

Обобщённая схема экспериментального дизайна представлена на Рисунок 2.1.

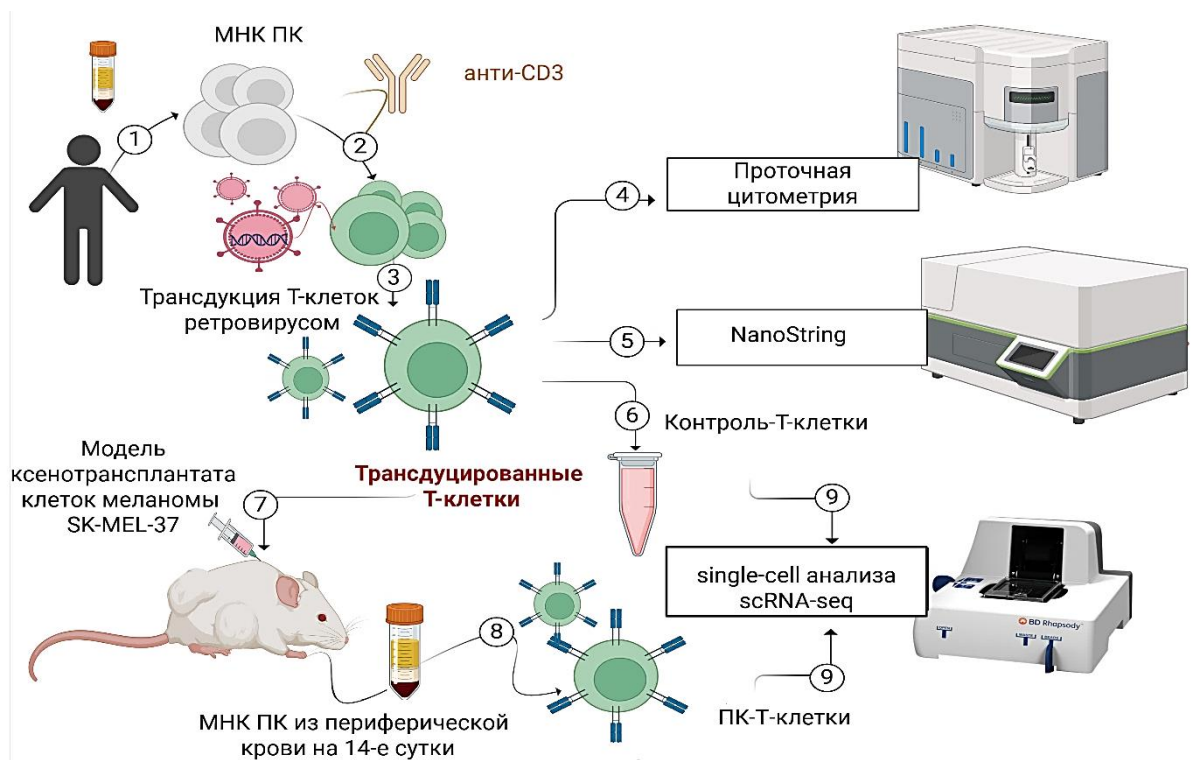


Рисунок 2.1 — Схема экспериментального исследования NY-ESO-1-специфичных TCR-модифицированных Т-клеток. На рисунке представлены следующие этапы работы: (1) выделение мононуклеарных клеток периферической крови (МНК ПК) от здоровых доноров; (2) стимуляция Т-клеток анти-CD3 антителами; (3) генетическая модификация клеток с использованием ретровирусного вектора, кодирующего NY-ESO-1-специфичный TCR; (4) комплексный анализ фенотипических и функциональных характеристик трансдуцированных Т-клеток

методом проточной цитометрии до и после со-культивирования с клетками меланомной линии SK-MEL-37; (5) параллельная оценка профиля экспрессии генов с помощью технологии NanoString; (6) криоконсервация части трансдуцированных Т-клеток в качестве контроля (Контроль-Т-клетки) для последующего одноклеточного РНК-секвенирования (scRNA-seq); (7) Введение трансдуцированных Т-клеток в модель ксенотрансплантата меланомы SK-MEL-37; (8) выделение МНК ПК из периферической крови мышей на 14-е сутки после инфузии NYESO1-TCR Т-клеток (ПК-Т-клетки); (9) проведение scRNA-seq пулов ПК-Т-клеток и Контроль-Т-клеток [Разработан автором].

2.2. Доноры

Забор венозной крови у шести здоровых доноров был одобрен локальным этическим комитетом НИИФКИ Минобрнауки России (решение №139 от 30.05.2022). Все участники подписали добровольное информированное согласие. Доноры принадлежали к европеоидной расе, являлись постоянными жителями Западной Сибири, средний возраст составил $27,33 \pm 3,98$ лет (среднее \pm стандартная ошибка среднего).

2.3. Ретровирусный вектор

Для генетической модификации Т-лимфоцитов использовали гамма-ретровирусные частицы вируса лейкемии мышей (MMLV), полученные на основе вектора pMS3-NY-ESO-1-TCR. Данный вектор кодирует оптимизированные α - и β -цепи Т-клеточного рецептора, специфичного к комплексу NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅/HLA-A*02:01 (Рисунок 2.2). Ключевой особенностью конструкции являются точечные аминокислотные замены Gly⁵⁰→Ala и Ala⁵¹→Glu в домене CDR2 β -цепи TCR, что привело к увеличению аффинности связывания: значение константы диссоциации K_d снизился с 21,4 мкМ для нативного рецептора до 1,9 мкМ для модифицированного варианта G50A+A51E. Ретровирусные частицы были любезно предоставлены профессором Х. Шикю (Медицинская школа университета Миэ, Япония)[245, 246].

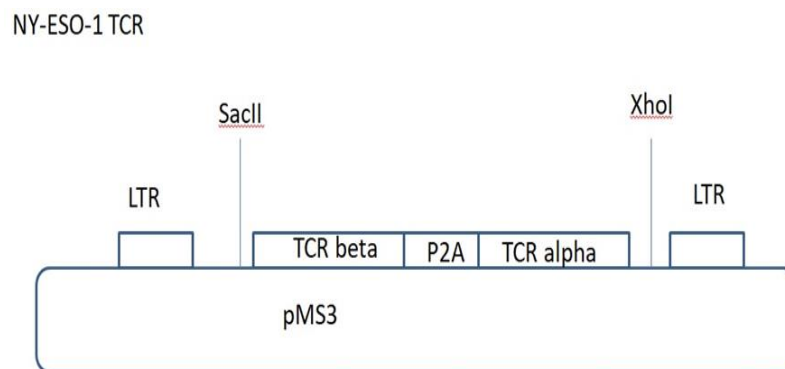


Рисунок 2.2— Схема γ -ретровирусного вектора pMS3-NY-ESO-1-TCR. Вектор содержит гены α - и β -цепей TCR, разделенные самопроцессирующимся 2A-пептидом (P2A), а также ключевые регуляторные элементы — 5'- и 3'-LTR (длинные концевые повторы) и сайты рестрикции SacII и XhoI.

2.4. Получение NY-ESO-1-специфичных TCR-T-лимфоцитов

2.4.1. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови

У каждого донора проводили забор периферической венозной крови в объеме не более 25 мл. Кровь собирали в пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (МНК ПК) осуществляли методом центрифугирования в градиенте плотности фикола-урографина Ficoll-Urografin (PanEco, Москва, Россия). Кровь предварительно разводили в равном объеме среды RPMI-1640 (Биолот, Санкт-Петербург, Россия), затем аккуратно наслаивали на раствор фикола-урографина ($\rho = 1,077$ г/мл) и центрифугировали при 400 g в течение 40 минут при комнатной температуре. МНК ПК собирали из интерфейса на границе раздела фаз.

2.4.2. Стимуляция пролиферации T-клеток

Экспансию МНК ПК *in vitro* индуцировали путем адсорбции ретронектина (25 мкг /мл, Takara Bio, Япония) и антител к CD3 (5мкг/мл, Biolegend, США) в лунках 12-луночных

планшетов (TPP, Швейцария). Выделенные МНК культивировали в концентрации $0,5 \cdot 10^6$ клеток/мл в среде GT-T551 (Takara Bio) с добавлением 300 ЕД/мл IL-2 (Ронколейкин, Биотех, Санкт-Петербург) и 0,6% человеческой сыворотки группы АВ при 37°C и 5% CO₂. На 2-3 сутки проводили частичную замену среды с добавлением свежего IL-2.

2.4.3. Ретровирусная трансдукция МНК ПК, стимулированных антителами к CD3

Для проведения ретровирусной трансдукции 1 мл ретровирусной суспензии размораживали на водяной бане при 37 °С. Затем суспензию разводили в четыре раза в PBS (Биолот, Санкт-Петербург, Россия), содержащем 2% альбумина человека (Микроген, Москва, Россия) и 5% глюкозо-цитратного буфера. Разбавленный раствор наносили в лунки 24-луночного планшета, предварительно покрытые ретронектином, после чего планшет с вирусным раствором центрифугировали в течение 2 ч при 32 °С и 2000× g (центрифуга Jouan MR 23, Нант, Франция). После промывки PBS с альбумином в лунки вносили $1,5-2 \times 10^5$ анти-CD3-стимулированных МНК ПК в среде с IL-2 и центрифугировали 10 мин при 1000× g и 32 °С. На момент трансдукции 90% клеточной популяции составляли CD3+-Т-лимфоциты. После центрифугирования планшеты инкубировали при 37 °С и 5% CO₂. На следующий день проводили второй раунд трансдукции: клетки переносили в свежие лунки с ретровирусными частицами, центрифугировали (10 мин, 1000× g, 32 °С) и инкубировали в тех же условиях. Через 6–8 ч клетки перемещали в 6-луночные планшеты (TPP, Швейцария) с 3,5 мл среды GT-T551 на лунку, дополненной IL-2 (300 ЕД/мл). На 9–10 сутки оценивали эффективность трансдукции и фенотип клеток методом проточной цитометрии. На 11 сутки трансдуцированные клетки со-культивировали с опухолевыми линиями для функционального анализа. Контрольную группу составили клетки, активированные анти-CD3 и IL-2 без ретровирусной трансдукции (нетрансдуцированные клетки).

2.5.Клеточные линии

Клеточные линии меланомы человека SK-Mel-37 и NW-Mel-38, экспрессирующие опухолевый антиген NY-ESO-1, а также линию аденокарциномы толстой кишки HCT-116 (NY-ESO-1-негативный контроль) были предоставлены профессором Х. Шику (Медицинская школа университета Миэ, Япония). Клетки культивировали в среде RPMI-1640, дополненной 10%

эмбриональной телячьей сывороткой (FCS, Hyclone, США), 2 мМ L-глутамином (Biolog, Россия), 5×10^{-5} мМ меркаптоэтанолом (Sigma, США), 25 мМ HEPES (Sigma, США), 80 мкг/мл гентамицина (Крка, Словения) и 100 мкг/мл ампициллина (Синтез, Россия). Поддержание культур осуществляли в культуральных флаконах при плотности $5,0-7,5 \times 10^4$ клеток/мл в логарифмической фазе роста. Перед экспериментами клетки обрабатывали трипсин-версеном (Биолот, Россия) и высевали в 96-луночные планшеты (TPP, Швейцария) по $4-5 \times 10^3$ клеток/лунку с последующей инкубацией 16-17 ч для адгезии. Экспрессию NY-ESO-1 анализировали методом проточной цитометрии с использованием PE-конъюгированных моноклональных антител кролика (клон D1Q2U, #65699, Cell Signaling Technology, США) по протоколу производителя (фиксация и пермеабиллизация метанолом). Результаты представлены на Рисунок 2.3.

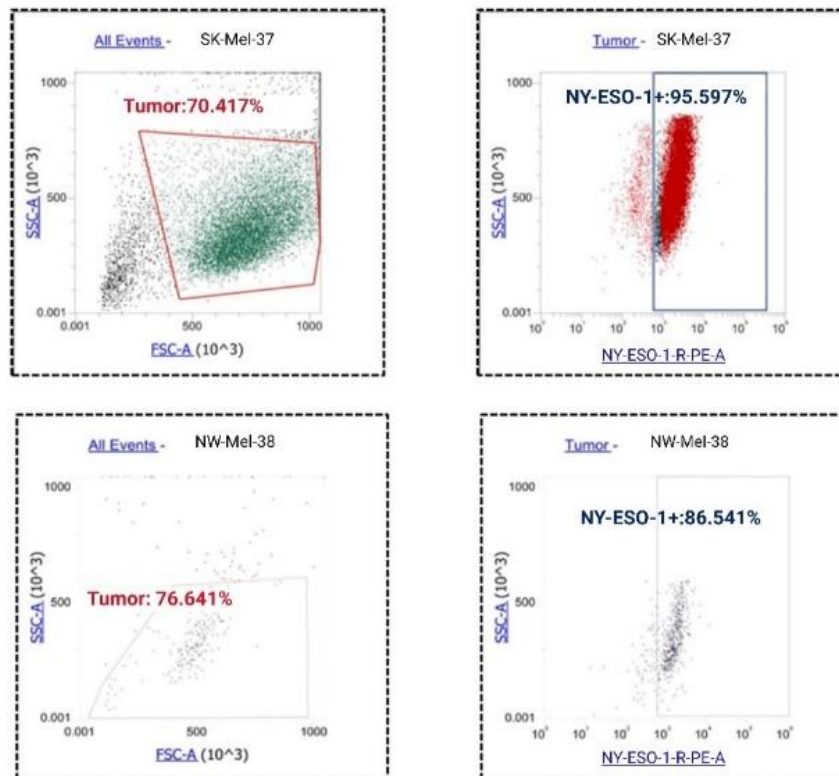


Рисунок 2.3 — Экспрессия опухолевого антигена NY-ESO-1 в клеточных линиях меланомы человека SK-Mel-37 и NW-Mel-38, определённая методом проточной цитометрии.

2.6. Оценка эффективности трансдукции и фенотипирования NY-ESO-1-специфичных Т-лимфоцитов

Для количественной оценки эффективности ретровирусной трансдукции Т клеток использовали биотинилированные МНС-тетрамеры (HLA-A*02:01/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅), конъюгированные со стрептавидином-PE (предоставлены проф. Х. Шику, Медицинская школа университета Миэ, Япония). Трансдуцированные и нетрансдуцированные (контрольные) клетки инкубировали с тетрамерами (разведение 1:100, 20 мин, комнатная температура, в темноте) с последующим многоцветным окрашиванием. Использовали стрептавидин-PE (1:600, BioLegend, США) и панель моноклональных антител к антигенам человека (BioLegend, США, 1:1000): анти-CD3-AF700 (#300324), анти-CD8-PerCy7 (#344712), анти-CD4-Bv570 (#300534), анти-CD45RA-Bv711 (#304138), анти-CD62L-AF488 (#304816), анти-TIM-3-APC/Cy7 (#345026), анти-PD-1-Bv421 (#329920). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью красителя Zombie Aqua™ (#423101, BioLegend, США).

Функциональную активность трансдуцированных Т-клеток-эффекторов анализировали в со-культуре с клеточной линией SK-MEL-37 (мишени) в соотношении 5:1 в течение 4–5 часов с последующим окрашиванием антителами к маркерам активации (BioLegend, США, 1:1000): анти-CD137(4-1BB)-BV711 (#309832), анти-CD154(CD40L)-PerCP/Cy5 (#310834) и цитотоксичности: анти-CD107a (LAMP-1)-APC/Cy7 (#328630), анти-CD178(FasL)-BV421 (#306412), анти-CD69-AF647 (#310918).

После двукратной промывки PBS с 0,1% NaN₃ клетки анализировали на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher Scientific). Нетрансдуцированные клетки служили контролем для определения эффективности трансдукции и неспецифического связывания. Во всех экспериментах использовали изотипические контроли и FMO (Fluorescence Minus One), а оборудование калибровали стандартными флуоресцентными частицами перед каждым запуском.

2.6.1. Анализ данных проточной цитометрии

Многомерный анализ данных проточной цитометрии выполняли с использованием двух независимых подходов на платформах Seurat и Cytosplore, анализировавших различные наборы маркеров. На этапе предобработки проводили стандартное гейтирование: исключение дребриса

(FSC-A/SSC-A), отбор синглетов (FSC-H/FSC-A), селекцию жизнеспособных CD3⁺ лимфоцитов и идентификацию МНС-тетрамер-позитивных трансдуцированных Т-клеток (Рисунок 2.4). Данные, полученные на цитометре Attune NxT (Thermo Fisher, США) в формате . fcs, конвертировали в .csv с использованием библиотеки fcsparser.

Первый подход реализовали в Seurat v5 [247] по аналогии с пайплайном одноклеточной транскриптомики (scRNA-seq). После фильтрации данных ($nCount_ADT < 10^6$) выполняли нормализацию методом Centered Log-Ratio (CLR). Снижение размерности осуществляли с помощью анализа главных компонент (PCA) с последующей коррекцией пакетных эффектов алгоритмом Harmony [248]. Кластеризацию проводили на основе графа ближайших соседей (SNN) с визуализацией в двумерном пространстве методом UMAP.

Валидацию кластеров осуществляли по экспрессии поверхностных маркеров (CD4, CD8, CD62L, CD45RA) с построением графиков признаков (feature plots). Экспрессию маркеров TIM-3 и PD-1 визуализировали с помощью точечных графиков (dot plots). Для количественного анализа клеточного состава построили составной столбчатый график (stacked bar plot), отображающий распределение Т-клеточных субпопуляций, с использованием библиотеки ggplot2.

Второй подход включал арксинус-трансформацию и нормализацию методом fdaNorm в R согласно протоколу Melsen et al. [249], с последующей кластеризацией алгоритмом HSNE (Hierarchical Stochastic Neighbor Embedding) в Cytosplore [246]. Анализ фокусировался на функциональных маркерах (CD8, CD40L, CD69, CD107a, 4-1BB, FasL), характеризующих цитотоксическую активность и состояние активации клеток.

Результаты кластеризации подвергали статистической обработке с визуализацией в виде блочных диаграмм в программе GraphPad Prism 9.4 (GraphPad Software, США).

2.7. Оценка цитотоксической активности *in vitro*

Цитотоксическую активность генно-модифицированных Т-лимфоцитов оценивали методом определения высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) с использованием коммерческого набора CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (#G1780, Promega Corporation, США) в соответствии с протоколом производителя. В качестве клеток-мишеней использовали опухолевые клеточные линии, экспрессирующие и не экспрессирующие антиген NY-ESO-1 (SK-Mel-37, NW-Mel-38 и HCT-116). После предварительной калибровки экспериментальных параметров (оптимальное количество клеток, время инкубации) в плоскодонные 96-луночные планшеты высевали по 4×10^3 опухолевых клеток на лунку и

инкубировали в течение 16-17 часов при 37°C и 5% CO₂. Затем культуральную среду заменяли на бессывороточную среду X-VIVO 15 (Lonza) и добавляли эффекторные клетки в количестве 20×10³ клеток на лунку (соотношение эффектор: мишень 5:1). Совместное культивирование проводили в течение 6-8 часов в стандартных условиях. Активность ЛДГ определяли в 50 мкл супернатанта с помощью 30-минутной ферментативной реакции с тетразолиевой солью INT, измеряя оптическую плотность образовавшегося формазана на планшетном ридере Varioskan (Thermo Fisher Scientific). Для расчета цитотоксической активности использовали следующие контроли: спонтанный лизис (клетки-мишени без эффекторов), максимальный лизис (клетки-мишени с детергентом) и фоновый сигнал (чистая культуральная среда). Процент специфического лизиса рассчитывали по формуле: [(Экспериментальный лизис – Спонтанный лизис) / (Максимальный лизис – Спонтанный лизис)] × 100. Статистическую обработку данных проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим попарным сравнением, скорректированным по методу Сидака в программе GraphPad Prism 9.4.

2.8. Количественная оценка продукции цитокинов

Для анализа цитокинового профиля TCR-трансдуцированные Т-лимфоциты со-культивировали с клетками опухолевой линии SK-Mel-37 в соотношении эффектор: мишень 5:1 в течение 48 часов. По завершении инкубации супернатанты собирали и замораживали при –80 °C до момента проведения анализа. Концентрацию цитокинов определяли с использованием мультиплексного набора LEGENDplex™ Human CD8/NK Panel (13-plex) с фильтр-пластинами (BioLegend, США, кат. № 740267) согласно инструкции производителя. Для анализа каждого образца использовали 25 мкл супернатанта. Сравнение цитокинового профиля проводили между TCR-трансдуцированными и контрольными (нетрансдуцированными) Т-клетками, со-культивированными с SK-Mel-37. Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 10.0.0 с использованием критерия Манна–Уитни для сравнения двух независимых групп. Результаты представляли в виде медианы и межквартильного размаха. Цитокины классифицировали по уровням концентрации для выявления значимых различий в иммунном ответе между экспериментальными группами.

2.9. Магнитная сортировка трансдуцированных Т-клеток для анализа экспрессии генов методом NanoString

Для детального исследования транскриптомных изменений в NY-ESO-1-специфичных Т-лимфоцитах проводили их селективное выделение из общей популяции трансдуцированных клеток. Клетки инкубировали с МНС-биотинилированными тетрамерами (10 мкл на 10^6 клеток) в охлаждённом растворе Версена, содержащем 0,5% BSA, в течение 20 минут. После двукратного отмывания добавляли магнитные наночастицы MojoSort™ Streptavidin (Biolegend, cat#480016) из расчёта 10 мкл на 10^6 клеток и проводили магнитную сепарацию с использованием системы MojoSort™ (Biolegend, cat#480019). Обогащённую популяцию клеток культивировали в течение 16-17 часов в среде с добавлением ИЛ-2 (300 ЕД/мл) для восстановления. Затем клетки сокультивировали с адгезивными опухолевыми клетками линии SK-Mel-37 (эффектор: мишень = 5:1) в течение 2 часов для индукции активационных сигналов. После инкубации Т-клетки отделяли от опухолевых интенсивным пипетированием в PBS и дополнительно очищали методом позитивной магнитной селекции с антителами к CD45 (MojoSort™ Human CD45 Nanobeads, cat#480029). Оценку жизнеспособности выделенных клеток проводили на автоматическом счётчике Countess 3 (Thermo Fisher Scientific) с трипановым синим, которая во всех экспериментах превышала 92%. Очищенные клетки использовали для выделения РНК и проведения NanoString-анализа.

2.10. Выделение тотальной РНК

Тотальную РНК экстрагировали из $300-600 \times 10^3$ клеток с использованием набора Total RNA Purification Plus Kit (Norgen Biotek, Канада) согласно протоколу производителя. Концентрацию и чистоту полученной РНК оценивали на спектрофотометре Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США) по показателям оптической плотности при 260/280 нм и 260/230 нм. Образцы РНК немедленно замораживали и хранили при -80°C до проведения дальнейших анализов.

2.11. Профилирование экспрессии генов методом Nanostring

Экспрессию генов анализировали на платформе NanoString nCounter SPRINT Profiler (NanoString Technologies, США) с использованием 100 нг тотальной РНК, выделенной из трёх групп (n=4): (1) нетрансдуцированные Т-клетки (контроль), (2) трансдуцированные NY-ESO-1-специфичные Т-клетки, отсортированные по связыванию с биотинилированными МНС-

тетрамерами, и (3) трансдуцированные Т-клетки после со-культуры с клетками SK-Mel-37 (CD45⁺-фракция). Использовали панель nCounter Human Immunology v2, содержащую 579 иммунорегуляторных генов, 15 референсных генов и 14 контрольных проб (6 положительных и 8 отрицательных). Гибридизацию проводили в течение 16 часов при 65°C в реакционной смеси (33 мкл), содержащей 5-14 мкл РНК, 3 мкл репортерных зондов, 0-7 мкл DEPC-воды, 11 мкл гибридизационного буфера и 5 мкл захватывающих зондов. После детекции на анализаторе nCounter данные нормализовали в программе nSolver 4.0 с использованием встроенных контролей и референсных генов. Пороговый уровень экспрессии определяли по формуле: $(\bar{X}_{_NEG} + 2 \times SD_{_NEG}) + \bar{X}_{_POS_E}$, где $\bar{X}_{_NEG}$ и $SD_{_NEG}$ - среднее значение и стандартное отклонение отрицательных контролей (n = 8), $\bar{X}_{_POS_E}$ - среднее значение положительных контролей POS_E (n = 6). Гены с уровнем экспрессии ниже рассчитанного порога исключали из анализа как неэкспрессируемые. Нормализованные данные log₂-трансформировали и экспортировали в GraphPad Prism 9.4 для статистического анализа. Дифференциальную экспрессию оценивали с помощью множественных t-тестов. Результаты визуализировали в виде вулкан-плота (volcano plot). Для выявления функционально значимых изменений проводили анализ обогащения генов (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) с использованием пакета GSEApy [250], что позволило выявить значимые функциональные пути и биологические процессы, ассоциированные с наблюдаемыми изменениями экспрессии генов.

2.12. Оценка противоопухолевой эффективности трансдуцированных Т-клеток в модели ксенотрансплантата клеток меланомы

Для оценки противоопухолевой эффективности использовали линию мышей NRG (NOD.Cg-Rag1tm1Mom Il2rgtm1Wjl/SzJ). Исследование проводилось в Центре генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН. В эксперимент включали самцов и самок в возрасте 8 недель, все животные имели статус SPF (specific pathogen-free). Мышей содержали однопольными семейными группами по 2-5 особей в индивидуально вентилируемых клетках (IVC) системы Opti Mice (Animal Care Systems) с поддержанием стандартных условий: температура 21–24 °С, относительная влажность 30–50 %, световой режим 12:12 (свет: темнота). Кормление осуществлялось рационом компании Ssniff (Зост, Германия), вода после обратного осмоса, обогащённая минеральной смесью, предоставлялась *ad libitum*. Для создания модели ксенотрансплантата человеческой меланомы мышам подкожно, в область правой лопатки, имплантировали по 5×10^6 клеток опухолевой линии SK-MEL-37 в суспензии 100 мкл среды RPMI. Эксперименты проводились в строгом соответствии с международными

стандартами по обращению с лабораторными животными, включая положения директивы Европейского сообщества 86/609/ЕЕС. Состояние животных контролировали каждые 2–3 дня, оценивая кожные покровы, двигательную активность и поведение. При появлении признаков токсичности (горбление, снижение активности, потеря массы тела более 20 % или резкое увеличение объёма опухоли), проводили эвтаназию согласно установленным этическим протоколам — путём передозировки CO₂ с последующей цервикальной дислокацией. Объём опухоли измеряли штангенциркулем и рассчитывали по формуле: $V = a \times b^2 \times 0,52$, где a — длина, b — ширина новообразования. При достижении среднего объёма опухоли 100 мм³ животные были случайным образом распределены на три группы: интактную (без терапии), контрольную (получавшую нетрансдуцированные Т-клетки) и экспериментальную (получавшую Т-клетки, трансдуцированные NY-ESO-1-TCR). Инъекции проводились внутривенно в дозе 8 млн/мышь. Статистическая обработка данных проводилась с использованием GraphPad Prism 10.0.0 (GraphPad Software, США). Сравнение между группами выполнялось методом двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с последующим тестом Тьюки для множественных сравнений ($n = 8$ в группе). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM).

2.13. Анализ экспрессии NY-ESO-1-специфичного TCR и выделение Т-лимфоцитов из модели ксенотрансплантата меланомы.

На 14-е сутки после введения трансдуцированных Т-клеток в модели ксенотрансплантата клеток меланомы SK-Mel-37, проводили забор периферической крови (до 1мл) в пробирки с ЭДТА. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (МНК ПК) осуществляли методом градиентного центрифугирования с использованием среды Фиколл-Урографин $\rho = 1,077$ г/мл (PanEco, Москва, Россия).

Для подтверждения сохранения экспрессии NY-ESO-1-специфичного TCR *in vivo* МНК ПК окрашивали PE-конъюгированными МНС-тетрамерами и флуоресцентно-мечёнными антителами к человеческому CD3 (Anti-CD3-AF700, BioLegend, cat#300324, США) в соответствии с ранее описанным протоколом.

Затем из пула МНК ПК проводили магнитную сортировку CD3-положительных Т-лимфоцитов с использованием набора MojoSort™ Human CD3 Selection Kit (BioLegend, cat#480134, США) согласно инструкции производителя. Чистоту выделенной фракции оценивали методом проточной цитометрии; содержание CD3⁺ клеток составляло не менее 95%. Полученные

Т-лимфоциты использовали для последующего анализа методом одноклеточного секвенирования (Single-Cell RNA Sequencing).

2.14. Подготовка образцов для single-cell анализа на платформе BD Rhapsody

Для проведения single-cell RNA-seq были отобраны две популяции Т-клеток: (1) преинфузионных NY-ESO-1-специфичных TCR-трансдуцированных Т-лимфоцитов (Контроль-Т-клетки, $n = 4$) и (2) периферических Т-клеток, выделенных от ксенотрансплантатом экспериментальной группы на 14-е сутки после инфузии трансдуцированных Т-клеток (ПК-Т-клетки, $n = 4$). Обе популяции метили Sample Tag антителами (BD Biosciences) в течение 20 минут при комнатной температуре (20-25°C) с последующей трехкратной отмывкой в PBS, содержащем 2% FBS. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью красителя Calcein AM (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом BD Rhapsody Single-Cell Analysis System (версия 5.0). После подсчета клеток на проточном цитофлуориметре Attune NxT (Thermo Fisher Scientific) образцы объединяли и ресуспендировали в охлажденном (4°C) образцовом буфере (BD Biosciences) до конечной концентрации 10 клеток/мкл в общем объеме 620 мкл. Качество загрузки клеток в картридж BD Rhapsody контролировали на системе InCell Analyzer 2000 (GE Healthcare) по сигналу Calcein.

2.14.1. Подготовка cDNA библиотек и секвенирование

Библиотеки для single-cell RNA-seq готовили с использованием системы BD Rhapsody Express Single-Cell Analysis System (BD Biosciences) согласно инструкции производителя. После лизирования клеток в микролунках картриджа проводили обратную транскрипцию и амплификацию cDNA (10 циклов ПЦР) с использованием панели праймеров Human Immune Response Primer Panel (BD Biosciences), содержащей праймеры к 397 генам иммунного ответа. Продукты ПЦР1 очищали магнитными частицами AMPure XP (Beckman Coulter), разделяя ампликоны мРНК и Sample Tag по размеру. Дополнительную амплификацию проводили методом semi-nested ПЦР (10 циклов) с последующей очисткой продуктов ПЦР2. Концентрацию ДНК измеряли на флуориметре Qubit (Thermo Fisher), после чего нормализованные библиотеки (4.5 нг/мкл мРНК и 1.0 нг/мкл Sample Tag) амплифицировали с индексами Illumina (6 циклов ПЦР для библиотеки мРНК и 8 циклов для библиотеки Sample Tag). Качество библиотек оценивали на

Qubit и Agilent BioAnalyzer 2100, затем объединяли в соотношении 94:6 (мРНК/Sample Tag) для получения ~20,000 и ~1,300 прочтений на клетку соответственно. Финальную библиотеку (2 нМ) секвенировали на Illumina NovaSeq 6000 (150 bp paired-end, 600 млн кластеров).

2.14.2. Обработка данных секвенирования

Первичную обработку данных секвенирования выполняли с использованием программного обеспечения BD Rhapsody версии 1.10.1L (BD Biosciences, США) в соответствии с протоколом производителя. На первом этапе проводили контроль качества исходных данных, включая фильтрацию низкокачественных чтений по следующим критериям: длина чтения, средний показатель качества (Q-score) и частота нуклеотидных замен. Затем осуществляли анализ R1-чтений для идентификации уникальных клеточных баркодов (cell barcodes) и уникальных молекулярных идентификаторов (unique molecular identifiers, UMI). R2-чтения выравнивали на референсные последовательности мРНК-генов с использованием алгоритма Bowtie2, после чего молекулы с одинаковыми идентификаторами объединяли в единый счётчик.

Для коррекции ошибок секвенирования и амплификации применяли два алгоритма: рекурсивную коррекцию замен (recursive substitution error correction, RSEC) и распределённую коррекцию ошибок (distribution-based error correction, DBEC).

Идентификацию клеточных событий осуществляли методом анализа второй производной, при этом клеточные баркоды, расположенные за точкой перегиба на графике распределения, исключали как шумовые.

Демультимплексирование образцов проводили с использованием набора single-cell multiplexing kit HS (BD Biosciences) для исключения мультиплетов.

Итоговые показатели качества секвенирования составили: уровень насыщения — 98%, медианный показатель DBEC — 8.6, что соответствует критериям глубокого секвенирования на платформе BD Rhapsody.

2.14.3. Контроль качества и анализ данных в Seurat

Анализ экспрессии генов проводили с использованием пакета Seurat V5 [247] в среде программирования R. На первом этапе выполняли контроль качества данных, объединение образцов и нормализацию с применением пакета SCTransform [251]. Для снижения размерности

данных использовали метод главных компонент (PCA), после чего проводили коррекцию межгрупповых вариаций (batch effect) с помощью пакета Harmony [248]. Дальнейшее снижение размерности выполняли методом Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) на основе 30 главных компонент, скорректированных Harmony. Кластеризацию клеток проводили с последующей идентификацией Т-лимфоцитов по каноническим маркерам [67] и сигнатуре экспрессии генов, полученной при анализе данных NanoString. Демультимплексирование кластеров осуществляли с использованием метаданных Sample Tag, разделяя клетки на две биологические группы: контрольные Т-клетки и Т-клетки периферической крови мыши. Внутрикластерный дифференциальный анализ экспрессии генов выполняли с помощью критерия Уилкоксона, учитывая биологическую и статистическую значимость ($\log_2(\text{fold change}) > 1.0$ или < -1.0 , $q\text{-value} < 0,001$).

Визуализацию данных проводили в Seurat, включая UMAP feature plots и Dot plot. Распределение кластеров Т-клеток отображали с помощью stacked bar plot, построенного в ggplot2. Статистическую значимость различий в составе кластеров оценивали с помощью множественных t-тестов ($n = 4$, $q\text{-value} < 0,05$) в программе GraphPad Prism 9.4. Анализ обогащения генов (GSEA) для дифференциально экспрессируемых генов в CD8⁺ эффекторных Т-клетках выполняли с использованием пакета GSEApy [250].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Получение NY-ESO-1-специфичных TCR-модифицированных T-лимфоцитов

Для генерации T-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор, специфичный к антигену NY-ESO-1, были использованы мононуклеарные клетки периферической крови (МНК ПК) здоровых доноров. Клетки активировали с применением анти-CD3 и IL-2, после чего проводили их экспансию и трансдукцию ретровирусной конструкцией, кодирующей NY-ESO-1-специфичный TCR. На 9-е сутки культивирования эффективность трансдукции оценивали по уровню связывания с МНС-тетрамерами, нагруженными эпитопом NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅. Средняя доля T-лимфоцитов, положительно окрашенных тетрамерами составила $22,13 \pm 7,11$ % (n = 6), варьируя от 13,4 % до 33,5 %. Жизнеспособность трансдуцированных клеток превышала 95 %, что свидетельствует о высоком качестве полученной популяции (Рисунок 3.1). В контрольной группе нетрансдуцированных клеток уровень фонового связывания с тетрамерами не превышал 0,1 %, что подтверждает специфичность связывания TCR к NY-ESO-1.

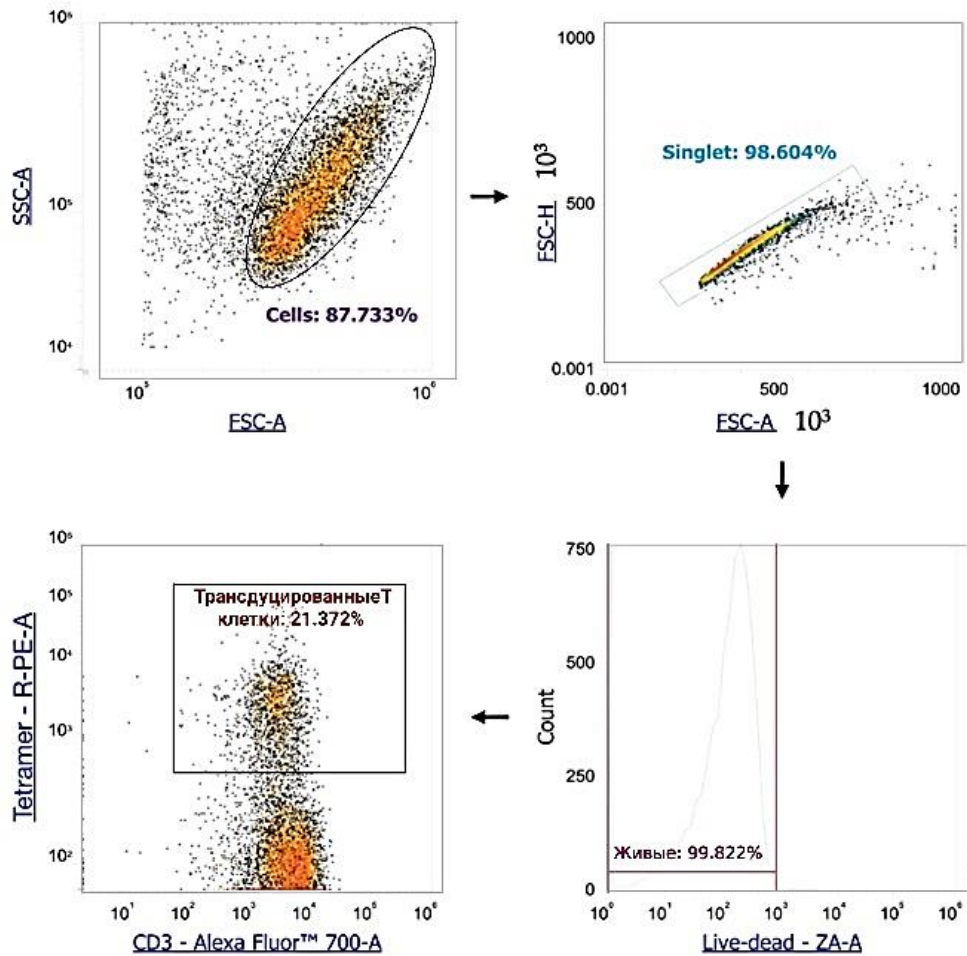


Рисунок 3.1 — Анализ экспрессии NY-ESO-1-специфичного TCR с использованием MHC-тетрамеров методом проточной цитометрии (репрезентативный образец)

3.2. Фенотипическая характеристика NY-ESO-1-специфичных TCR-T-лимфоцитов: преобладание наивного фенотипа

На 9-е сутки после трансдукции T-лимфоцитов конструкцией, кодирующей TCR, специфичный к NY-ESO-1, была проведена фенотипическая оценка трансдуцированных клеток ($n = 4$) методом многоцветной проточной цитометрии. Для анализа использовались линейные маркеры (CD4, CD8), маркеры памяти (CD45RA, CD62L), а также ингибиторные рецепторы (PD-1 и TIM-3). Для визуализации клеточных кластеров использовался алгоритм снижения размерности UMAP, который позволил выделить четыре фенотипически различимые субпопуляции: CD4⁺ наивные T-клетки (CD62L⁺CD45RA⁺), CD8⁺ наивные T-клетки (CD62L⁺CD45RA⁺), CD4⁺ терминально дифференцированные эффекторные T-клетки памяти (TE;

CD62L-CD45RA⁺) и CD8⁺ терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти (TE; CD62L-CD45RA⁺) (Рисунок 3.2). Большинство NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитов демонстрировали наивный фенотип. Средняя доля CD4⁺ наивных Т-клеток составила $62,54 \pm 9,23 \%$, а CD8⁺ наивных Т-клеток — $12,53 \pm 3,19 \%$ от общего числа трансдуцированных клеток (среднее значение \pm стандартное отклонение; $n = 4$) (Рисунок 3.2).

Анализ экспрессии ингибиторных молекул выявил четкую зависимость от стадии дифференцировки клеток. Коэкспрессия PD-1 и TIM-3 наблюдалась в терминально дифференцированных эффекторных Т-клетках памяти (CD4⁺ TE и CD8⁺ TE). В наивных Т-клетках коэкспрессия отсутствовала; рецепторы экспрессировались раздельно: в наивных CD4⁺ Т-клетках обнаруживалась экспрессия TIM-3, а в наивных CD8⁺ Т-клетках — экспрессия PD-1 (Рисунок 3.3).

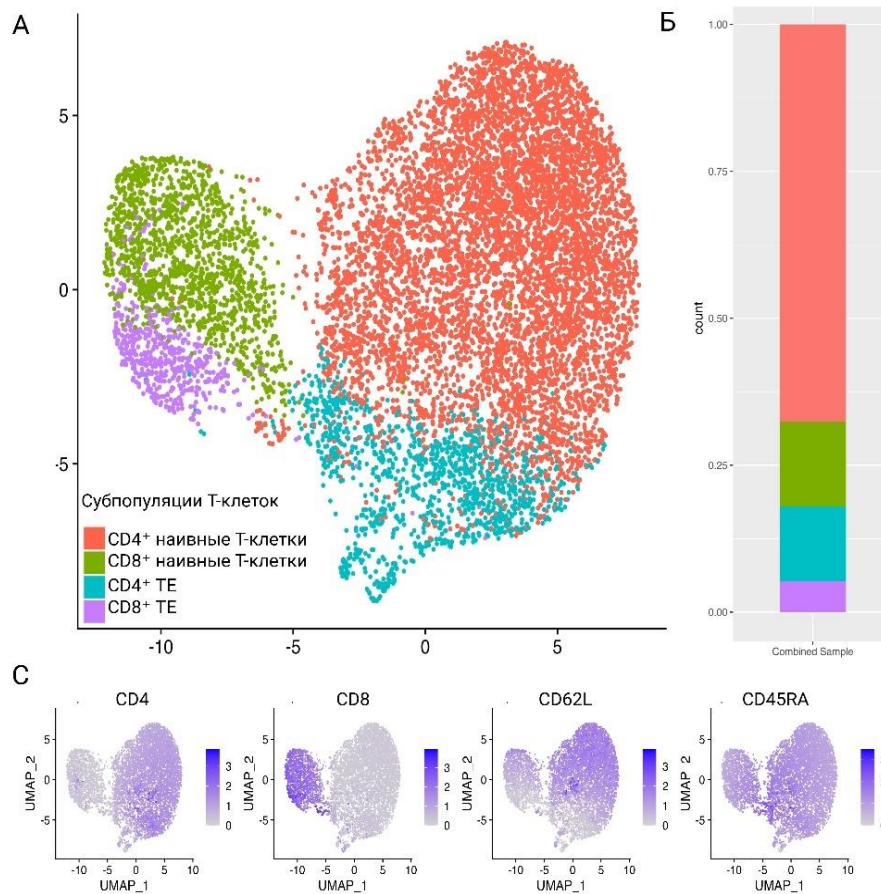


Рисунок 3.2 — Иммунофенотипический анализ NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитов методом проточной цитометрии. (А) UMAP-визуализация клеточных кластеров, отражающая пространственное распределение отдельных клеток на основе уровня экспрессии маркеров CD4, CD8, CD45RA и CD62L. (В) Количественное распределение субпопуляций. Столбчатая диаграмма, демонстрирующая процентное соотношение выделенных субпопуляций (среднее \pm

стандартное отклонение, $n = 4$). (С) Экспрессия кластер-определяющих маркеров. Интенсивность окраски соответствует уровню экспрессии от низкой (светло-синий) до высокой (темно-синий); TE — терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти.

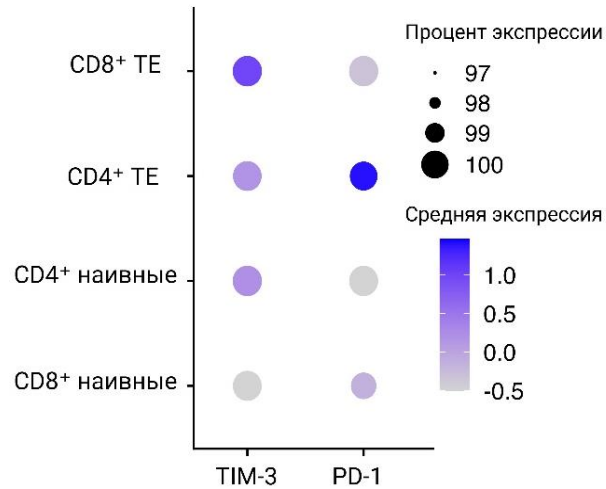


Рисунок 3.3 — Экспрессия ингибиторных молекул PD-1 и TIM-3 на субпопуляциях NY-ESO-1-специфичных TCR-T-клеток. Размер точек пропорционален доле клеток, экспрессирующих соответствующий маркер. Интенсивность окраски соответствует средней интенсивности флуоресценции (MFI) — от низкой (светло-синий) до высокой (темно-синий). Данные представлены для 4 доноров ($n = 4$). TE — терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти.

3.3. Транскриптомный профиль NY-ESO-1-специфичных TCR-T-лимфоцитов

Для комплексной характеристики молекулярных особенностей NY-ESO-1-специфичных TCR-T-клеток был выполнен поэтапный транскриптомный анализ. На первом этапе проведена сортировка антиген-специфичных Т-лимфоцитов с использованием МНС-тетрамеров, нагруженных пептидом NY-ESO-1, с целью выделения чистой популяции. Далее транскриптомные профили отсортированных NY-ESO-1-специфичных TCR-T-клеток сравнивали с контрольной популяцией нетрансдуцированных клеток, активированных анти-CD3 и IL-2 без ретровирусной трансдукции. Анализ методом NanoString выявил достоверное повышение экспрессии генов, связанных с миграцией и адгезией (*CCR2*, *CCR5*, *ITGAM*), ко-

стимуляцией (*CD96*, *TNFSF8*) в трансдуцированных клетках по сравнению с контролем (Рисунок 3.4).

Для оценки ранних транскрипционных изменений, происходящих при взаимодействии с опухолевыми клетками, был проведён сравнительный анализ до и после двухчасового сокультивирования отсортированных NY-ESO-1-специфичных TCR-T-клеток с NY-ESO-1-положительной линией SK-Mel-37 (в соотношении 5:1; эффекторы — TCR-T-лимфоциты, мишени — опухолевые клетки). После инкубации выполнена сортировка CD45⁺ клеток с целью исключения контаминации опухолевой РНК. Анализ выявил достоверные изменения экспрессии 210 генов: отмечено повышение экспрессии 78 генов, включая гены провоспалительных цитокинов (*IL6*, *IL8*), компонентов МНС II класса (*HLA-DRB1*, *HLA-DPA1*) и факторов транскрипции (*AHR*, *IRF1*), а также снижение экспрессии 132 генов, среди которых — компоненты TCR-сигнального комплекса (*CD3E*, *CD8A*, *CD247* (*CD3-ζ*), *CD4*, *CD27*, *CD28*, *ZAP70* и *LCK*) и регуляторные гены (*FOXP3*, *TGFB1*, *CTLA-4*) (Рисунок 3.5, Таблица 3.1).

Анализ обогащения набора генов (GSEA), выполненный на основании группы генов с повышенной экспрессией, показал значительную активацию трёх ключевых сигнальных путей: 1) сигнальный путь интерферона-γ, 2) позитивная регуляция активации Т-клеток, 3) регуляция пролиферации Т-лимфоцитов (Рисунок 3.6, Таблица 3.2). Таким образом, транскриптомный анализ позволил выявить характерные изменения экспрессии генов в NY-ESO-1-специфичных TCR-T-клетках как в покое, так и при взаимодействии с опухолевыми клетками, демонстрируя быструю перестройку транскриптомного профиля в течение первых часов контакта, характеризующуюся активацией экспрессии генов, входящих в IFN-γ-зависимый сигнальный путь, при одновременном снижении экспрессии компонентов TCR-сигнального аппарата.

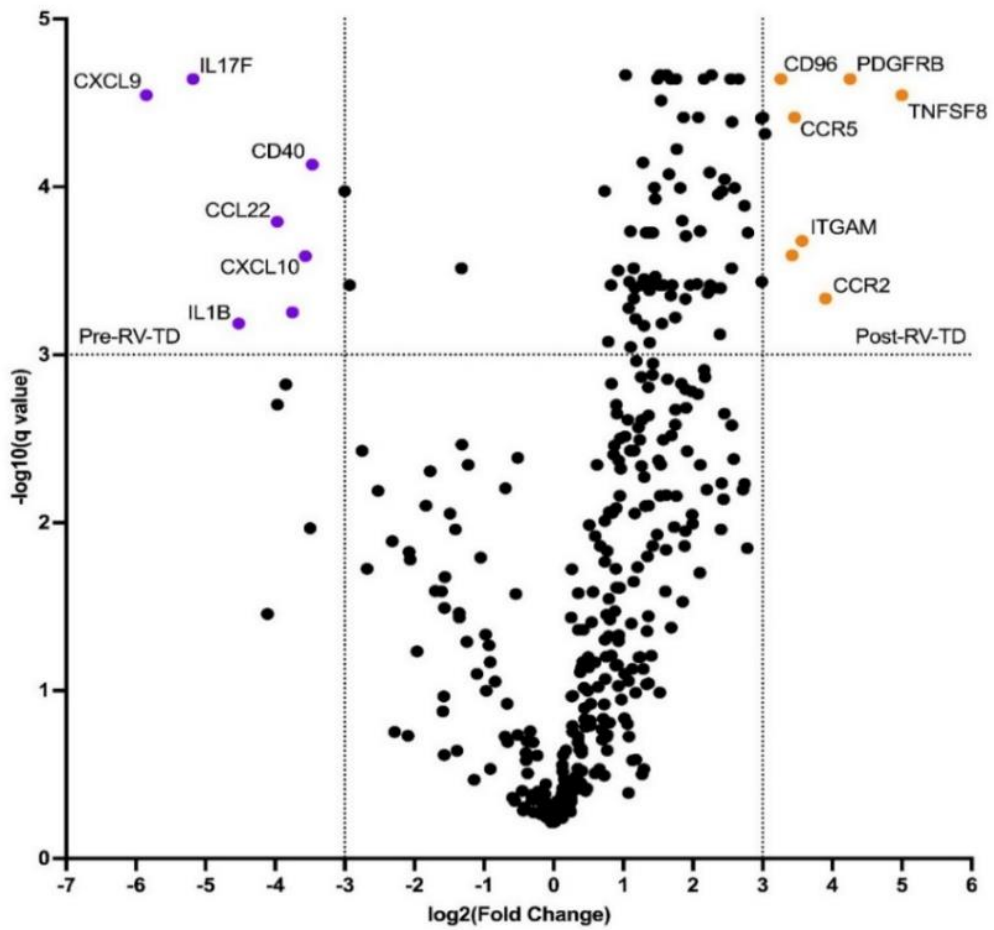


Рисунок 3.4 — Volcano-plot анализа дифференциальной экспрессии генов в NY-ESO-1-специфичных TCR-T-лимфоцитах. Оранжевыми точками обозначены гены с повышенной экспрессией ($\log_2FC > 3,0$ при $q < 0,001$), фиолетовыми — с пониженной экспрессией ($\log_2FC < -3,0$ при $q < 0,001$), чёрным — гены без статистически значимых изменений. Анализ выполнен методом NanoString с применением множественных t-тестов ($n = 4$).

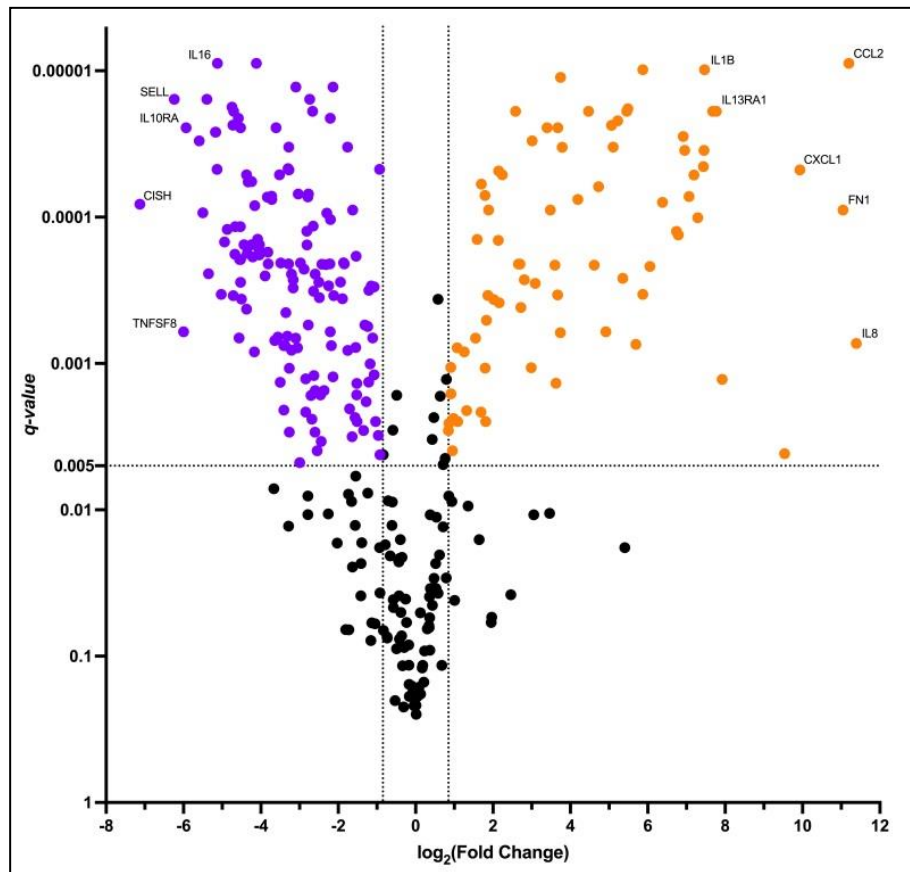


Рисунок 3.5 — Volcano-plot анализа дифференциальной экспрессии генов в NY-ESO-1-специфичных TCR-T-лимфоцитах после сокультивирования с опухолевой клеточной линией SK-Mel-37. Оранжевыми точками обозначены гены с повышенной экспрессией ($\log_2\text{FC} > 0,847$ при $q < 0,005$), фиолетовыми — с пониженной экспрессией ($\log_2\text{FC} < -0,847$ при $q < 0,005$), чёрным — гены без статистически значимых изменений. Анализ выполнен методом NanoString с применением множественных t-тестов ($n = 4$).

Таблица 3.1 — Гены с дифференциальной экспрессией в TCR-T-лимфоцитах, специфичных к NY-ESO-1, после сокультивирования с опухолевой клеточной линией SK-Mel-37.

Гены с повышенной экспрессией
<i>AHR, APP, ATG5, ATG7, BCL6, BST1, BST2, CIQBP, CIR, CIS, C3, CCL2, CCL20, CD164, CD22, CD274, CD276, CD59, CD81, CD83, CD9, CEBPB, CFI, CIITA, CSF1, CTNNB1, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL2, EDNRB, FCGR2A, FNI, GBP1, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB3, ICAM1, IFIH1, IFNGR1, IKBKAP, IL13RA1, IL1A, IL1B, IL1RAP, IL6, IL6ST, IL8, IRAK2, IRF1, ITGA6, LIF, LTBR, NCAM1, NFKBIA, NT5E, PDCD1LG2, PLAUR, PRKCD, PSMB5, PSMB7, PTK2, RELB, SMAD5, SOCS3, SPP1, TFRC, TGFB1, THY1, TLR2, TNFRSF9.</i>
Гены с пониженной экспрессией
<i>ADA, ARHGDI, B2M, BAX, BCL2, CASP1, CASP8, CCL5, CCND3, CCR1, CCR2, CCR5, CCR7, CD2, CD244, CD247, CD27, CD28, CD3D, CD3E, CD4, CD45RO, CD45RA, CD45RB, CD48, CD5, CD53, CD6, CD7, CD70, CD80, CD8A, CD8B, CD96, CD99, CFH, CISH, CSF2RB, CTLA4-TM, CX3CR1, CXCR3, CXCR4, CXCR6, DPP4, ETS1, FKBP5, FOXP3, GBP5, GNLY, GPR183, GZMA, HAVCR2, HLA-A, HLA-B, ICAM2, ICAM3, ICOS, IFITM1, IFNAR2, IKBKB, IKBKE, IKZF1, IL10RA, IL12RB1, IL16, IL18R1, IL18RAP, IL21R, IL2RB, IL2RG, IL4R, IRAK4, IRF4, ITGA4, ITGAL, ITGAM, ITGB2, JAK1, JAK2, JAK3, KLRB1, KLRC1, KLRC2, KLRC3, KLRC4, KLRK1, LAIR1, LCK, LCP2, LEF1, MALT1, MAP4K1, MAP4K2, MAPK1, MAPKAPK2, MBP, MUC1, MYD88, NCF4, NFATC2, NFATC3, PDGFRB, PECAMI, PRDMI, PRF1, PSMB10, PSMB8, PSMB9, PTGER4, PTPN22, PTPN6, PYCARD, RARRES3, SIPR1, SELL, SELPLG, SH2D1A, SIGIRR, SLAMF1, SLAMF7, SOCS1, STAT4, STAT5A, STAT5B, TAGAP, TBX21, TGFB1, TGFB2, TLR1, TMEM173, TNFRSF11A, TNFRSF14, TNFRSF1B, TNFSF10, TNFSF12, TNFSF4, TNFSF8, TP53, TRAF5, TYK2, UBE2L3, ZAP70.</i>

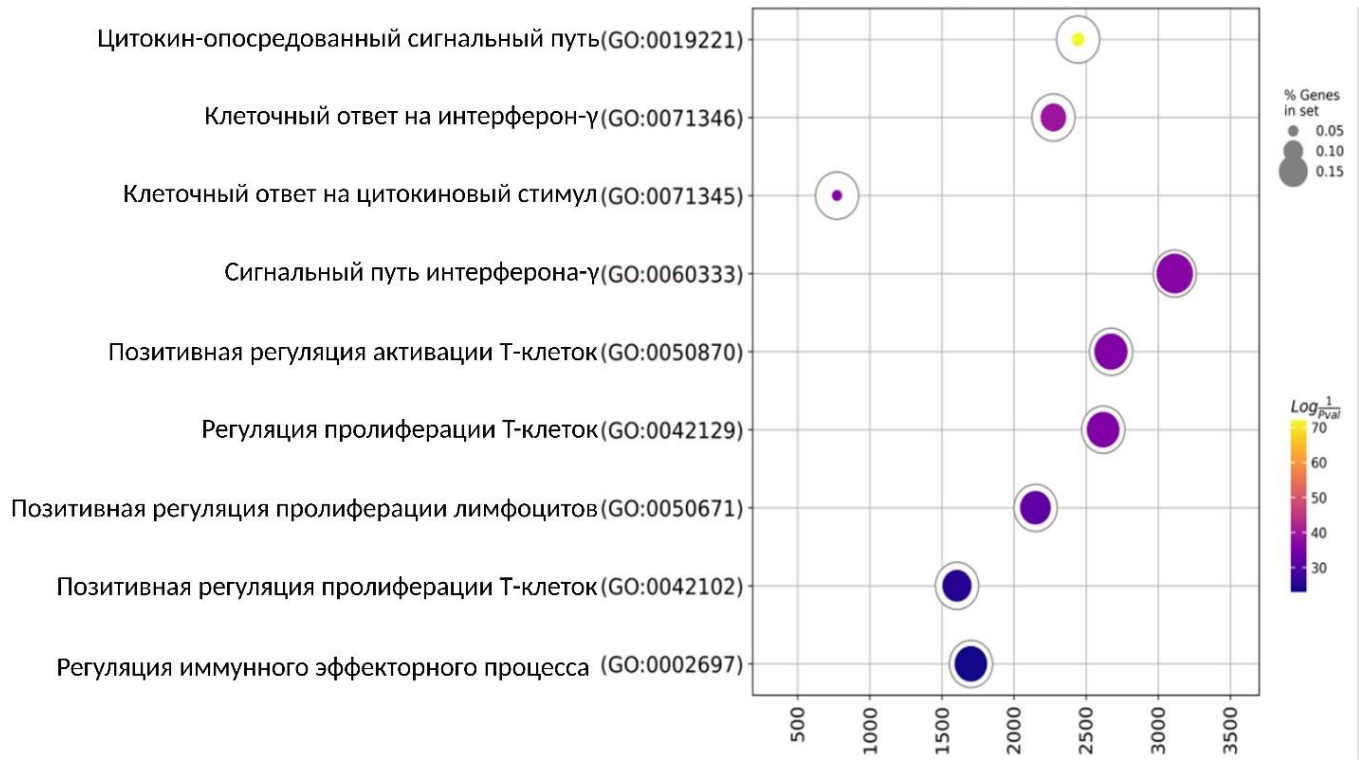


Рисунок 3.6 — GSEA-анализ биологических процессов, ассоциированных с повышенной экспрессией генов в NY-ESO-1-специфичных TCR-T-клетках после 2-часового сокультивирования с опухолевой клеточной линией SK-Mel-37. Цвет кругов соответствует степени значимости (желтые оттенки — более значимые), а размер кругов пропорционален доле генов, вовлечённых в соответствующий биологический процесс по данным аннотаций Gene Ontology. Полные результаты приведены в Таблице 3.2.

Таблица 3.2 — Результаты GSEA-анализа биологических процессов, ассоциированных с повышенной экспрессией генов в NY-ESO-1-специфичных TCR-T-клетках после 2-часового сокультивирования с опухолевой клеточной линией SK-Mel-37.

Биологический процесс/путь	Перекрытие (гены)	q-Значение	Комбинированный балл	Основные гены
Цитокин-опосредованный сигнальный путь	37/621	0.0	2443.644	<i>CIITA, CSF1, CXCL1, IL1RAP, CXCL2, ICAM1, SOCS3, PSMB7, PSMB5, IRAK2, CCL2, NCAM1, GBP1, HLA-DQA1, HLA-DPA1, IL13RA1, CCL20, IFNGR1, TNFRSF9, PRKCD, LIF, FN1, NFKB1A, BST2, IL1A, CXCL10, CXCL11, IL6, BCL6, IRF1, IL1B, HLA-DPB1, HLA-DRA, LTBR, IL6ST, HLA-DRB3, HLA-DRB1</i>
Клеточный ответ на интерферон-γ	16/121	0.0	2272.529	<i>CIITA, CCL20, IFNGR1, PRKCD, ICAM1, IRF1, HLA-DPB1, HLA-DRA, CCL2, NCAM1, HLA-DRB3, GBP1, HLA-DQA1, HLA-DRB1, TLR2, HLA-DPA1</i>

Биологический процесс/путь	Перекрытие (гены)	q-Значение	Комбинированный балл	Основные гены
Клеточный ответ на цитокиновый стимул	23/482	0.0	772.551	<i>CSF1, CCL20, IFNGR1, LIF, FNI, CXCL1, IL1RAP, CXCL2, ICAMI, IL1A, CXCL10, SOCS3, IL6, BCL6, IRAK2, IRF1, IL1B, CCL2, IL6ST, GBP1, TLR2, HLA-DPA1, IL13RA1</i>
Сигнальный путь интерферона- γ	13/68	0.0	3113.543	<i>CIITA, IFNGR1, PRKCD, ICAMI, IRF1, HLA-DPB1, HLA-DRA, NCAMI, HLA-DRB3, GBP1, HLA-DQA1, HLA-DRB1, HLA-DPA1</i>
Позитивная регуляция активации Т-клеток	13/75	0.0	2671.611	<i>CD274, TFRC, CD81, PDCD1LG2, THY1, IL6, HLA-DMB, IL1B, HLA-DPB1, CCL2, IL6ST, HLA-DPA1, CD276</i>
Регуляция пролиферации Т-клеток	13/76	0.0	2617.250	<i>CD274, CEBPB, TFRC, PDCD1LG2, IL6, HLA-DMB, IL1B, HLA-DPB1, IL6ST, HLA-DRB1, HLA-DPA1, IDO1, CD276</i>

Биологический процесс/путь	Перекрытие (гены)	q-Значение	Комбинированный балл	Основные гены
Позитивная регуляция пролиферации лимфоцитов	12/75	0.0	2148.229	<i>CD274, BST1, IL6, HLA-DMB, TFRC, CD81, IL1B, HLA-DPB1, PDCD1LG2, IL6ST, HLA-DPA1, CD276</i>
Позитивная регуляция пролиферации Т-клеток	10/66	0.0	1604.452	<i>CD274, IL6, HLA-DMB, TFRC, IL1B, HLA-DPB1, PDCD1LG2, IL6ST, HLA-DPA1, CD276</i>
Регуляция иммунного эффекторного процесса	9/53	0.0	1700.874	<i>C3, CIS, CD81, CIR, CIQBP, CFI, HLA-DRA, CD59, HLA-DRB1</i>

Примечание: q-value < 0,000001

3.4. Антиген-специфическая цитотоксичность NY-ESO-1-специфичных TCR-модифицированных Т-лимфоцитов

Специфическую цитотоксическую активность NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитов оценивали по их способности лизировать NY-ESO-1-положительные (SK-Mel-37, NW-Mel-38) и NY-ESO-1-негативную (HCT-116) опухолевые линии при соотношении эффекторы:мишени 5:1 в течение 6–8 часов. В качестве контроля использовали нетрансдуцированные Т-лимфоциты того же донора.

Как показано на рисунок 3.7, NY-ESO-1TCR-T-клетки демонстрировали достоверно более высокую цитотоксичность по сравнению с контролем в отношении обеих NY-ESO-1-положительных линий. В отношении NY-ESO-1-негативной линии HCT-116 статистически значимых различий между группами выявлено не было. Кроме того, TCR-T-клетки лизировали NY-ESO-1-положительные линии значительно эффективнее, чем NY-ESO-1-негативную линию.

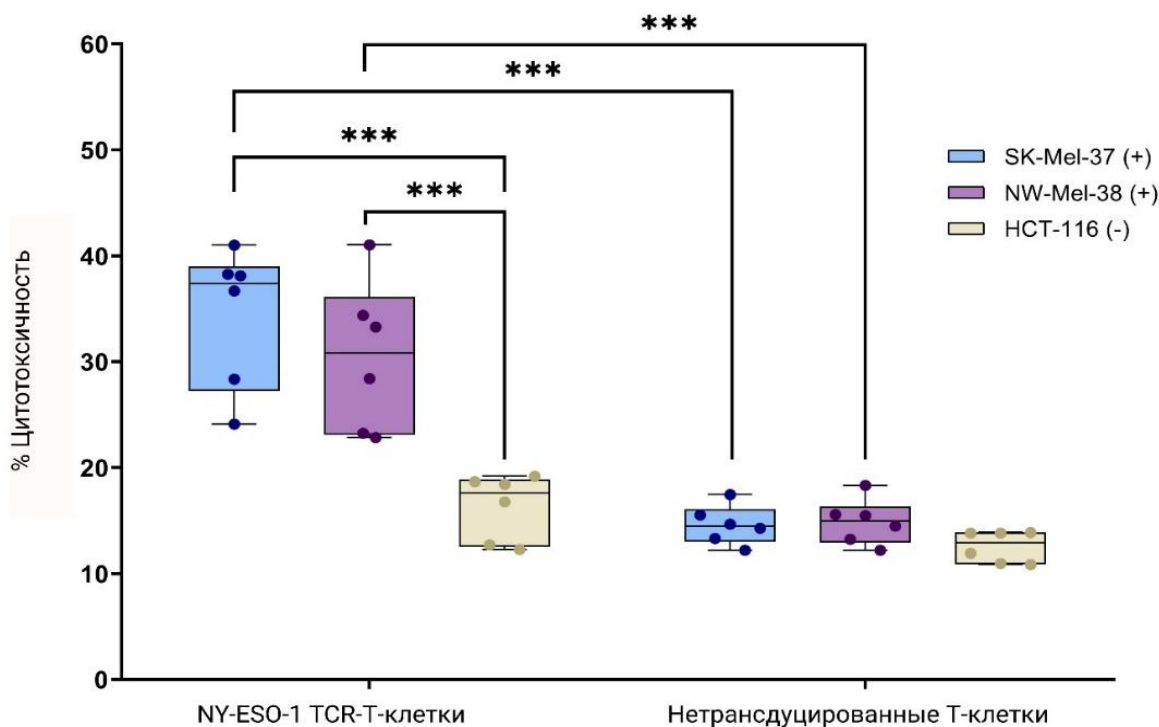


Рисунок 3.7 — Цитотоксическая активность TCR-T-лимфоцитов в отношении опухолевых клеток с различной экспрессией NY-ESO-1 ($n = 6$). Цитотоксичность оценивалась по уровню ЛДГ после 6–8 часов совместного культивирования при соотношении эффектор:мишень 5:1. Клеточные линии: SK-Mel-37⁺ и NW-Mel-38⁺ (NY-ESO-1⁺), HCT-116⁻ (NY-ESO-1⁻). Данные представлены как медиана (межквартильный интервал, минимум-максимум). Статистически значимые отличия обозначены скобками; *** — $p < 0,001$.

3.5. Характеристика цитотоксических субпопуляций NY-ESO-1-специфичных CD8⁺ TCR-модифицированных Т-лимфоцитов

Через 4–5 часов сокультивирования трансдуцированных TCR-Т-лимфоцитов с опухолевыми клетками линии SK-Mel-37 (NY-ESO-1⁺) был проведён многоцветный проточно-цитометрический анализ с применением алгоритма HSNE, выполненный на предварительно отобранных по экспрессии CD8⁺ Т-лимфоцитах. В результате кластерного анализа были выделены три основные субпопуляции CD8⁺ Т-лимфоцитов (Рисунок 3.8): (1) доминирующая субпопуляция ($67,50 \pm 3,89\%$; среднее значение \pm стандартная ошибка среднего, $n = 6$) с фенотипом CD8⁺FasL⁺CD107a⁺CD40L⁻CD69⁻4-1BB⁻, (2) субпопуляция ($17,63 \pm 5,92\%$) с фенотипом CD8⁺CD107a⁺CD40L⁻CD69⁻4-1BB⁻FasL⁻, и (3) субпопуляция ($12,50 \pm 5,23\%$) CD8⁺FasL⁺CD69⁺CD107a⁺CD40L⁻4-1BB⁻.

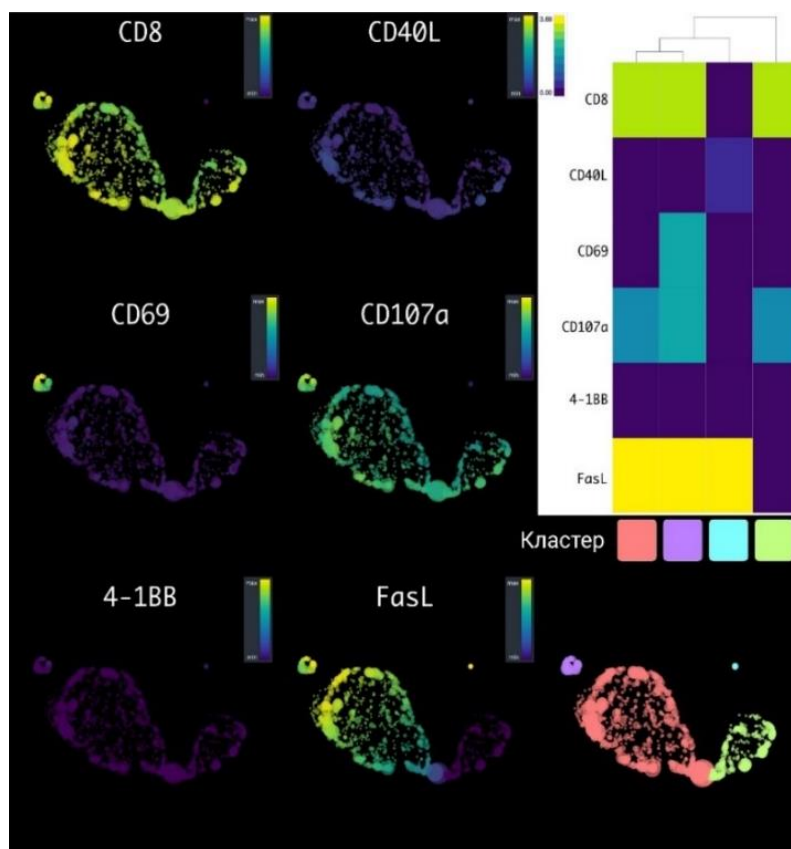


Рисунок 3.8 — HSNE-визуализация NY-ESO-1-специфичных CD8⁺ TCR-модифицированных Т-лимфоцитов после сокультивирования с NY-ESO-1⁺ клетками опухолевой линии SK-Mel-37. Культивирование проводили при соотношении эффектор:мишень 5:1 в течение 4–5 часов ($n = 6$). Точечные графики (HSNE) отображают пространственное распределение клеточных кластеров

на уровне отдельных клеток. Интенсивность экспрессии маркеров (CD8, CD40L, CD69, CD107a, 4-1BB, FasL) представлена цветовой шкалой: фиолетовый — низкая экспрессия, жёлтый — высокая экспрессия. Кластеры обозначены цветами (красный, фиолетовый, синий, зелёный,) в соответствии с тепловой картой.

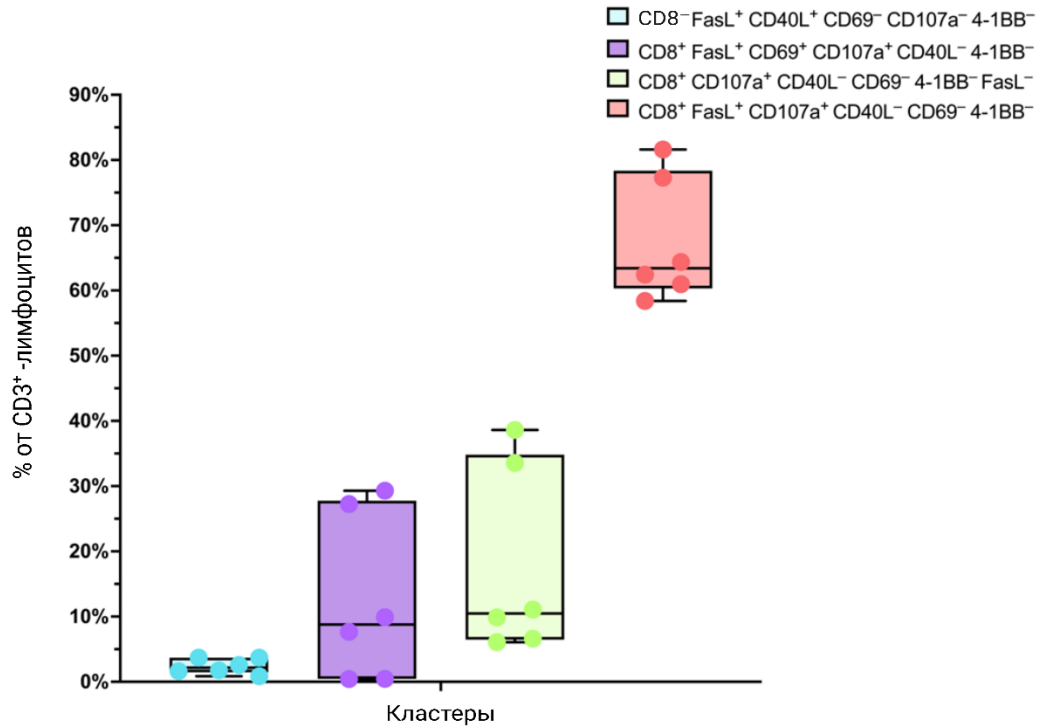


Рисунок 3.9 — Процентное содержание субпопуляций NY-ESO-1-специфичных CD8⁺ TCR-модифицированных Т-лимфоцитов после сокультивирования с NY-ESO-1⁺ клетками опухолевой клеточной линии SK-Mel-37 (n = 6). Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (SEM).

3.6. Анализ продукции цитокинов и цитотоксических молекул NY-ESO-1-специфичных TCR-T-лимфоцитов при взаимодействии с опухолевыми клетками

Для оценки продукции цитокинов и цитотоксических молекул была проанализирована секреторная активность NY-ESO-1-специфичных TCR-модифицированных и нетрансдуцированных (контрольных) T-лимфоцитов после 48-часового сокультивирования с NY-ESO-1-положительной опухолевой клеточной линией SK-Mel-37. Полученные данные мультиплексного анализа (LEGENDplex™) продемонстрировали достоверное повышение продукции гранзима В, гранзима А, гранулизина, перфорина, IFN- γ , TNF- α , растворимого Fas-лиганда (sFasL), а также интерлейкинов IL-6 и IL-17 в культуре трансдуцированных T-лимфоцитов по сравнению с контролем (Рисунок 3.10).

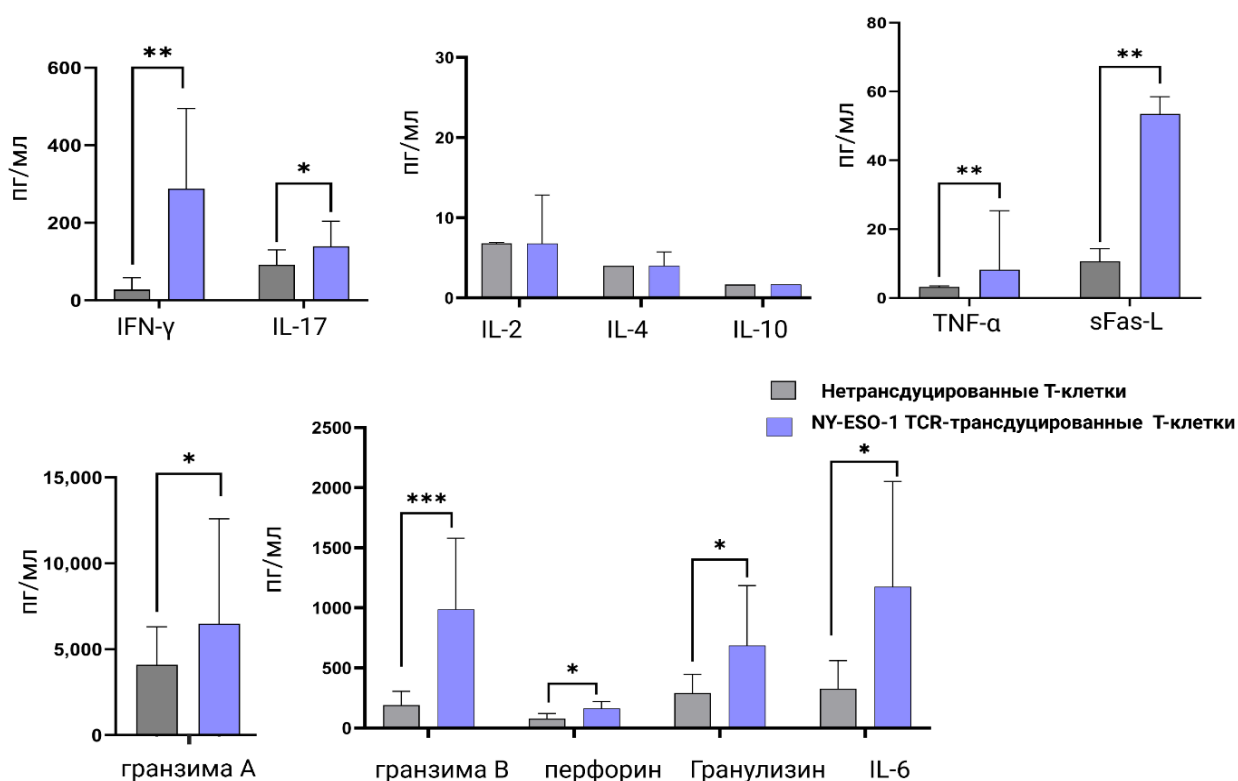


Рисунок 3.10 — Продукция цитокинов NY-ESO-1-специфичными TCR-T-клетками и нетрансдуцированными T-клетками при сокультивировании с клеточной линией SK-Mel-37 (NY-ESO-1⁺). Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха. Статистическая значимость различий оценивалась с помощью U-критерия Манна–Уитни: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Статистически значимые различия между группами обозначены скобками. Параметры культивирования: соотношение эффектор:мишень — 5:1, продолжительность — 48 ч, $n = 6$.

3.7. Противоопухолевая активность NY-ESO-1-специфичных TCR-T-лимфоцитов в модели ксенотрансплантата меланомы SK-MEL-37

Для оценки противоопухолевой активности Т-клеток, экспрессирующих NY-ESO-1-специфичный TCR, была использована модель ксенотрансплантата меланомы у иммунодефицитных мышей NRG. Мышам подкожно вводили клетки опухолевой линии SK-MEL-37 в дозе 5 млн/мышь. После достижения объёма опухоли 80–100 мм³ животных рандомизировали на три группы по 8 особей в каждой: интактную (без терапии), контрольную группу (получавшую инфузию нетрансдуцированных Т-клеток) и экспериментальную группу (получавшую инфузию NY-ESO-1-специфичных TCR-T-клеток).

В экспериментальной группе однократное введение NY-ESO-1-TCR-T-клеток привело к полной регрессии опухоли. На 7-й день после инфузии значительное ингибирование роста было отмечено у 4 из 8 мышей, а к 14-му дню полная регрессия была зафиксирована у всех животных группы (8/8). В контрольной группе наблюдалось лишь умеренное замедление роста опухоли, в то время как в интактной группе регистрировался стабильный прогрессирующий рост в течение всего эксперимента (Рисунок 3.11).

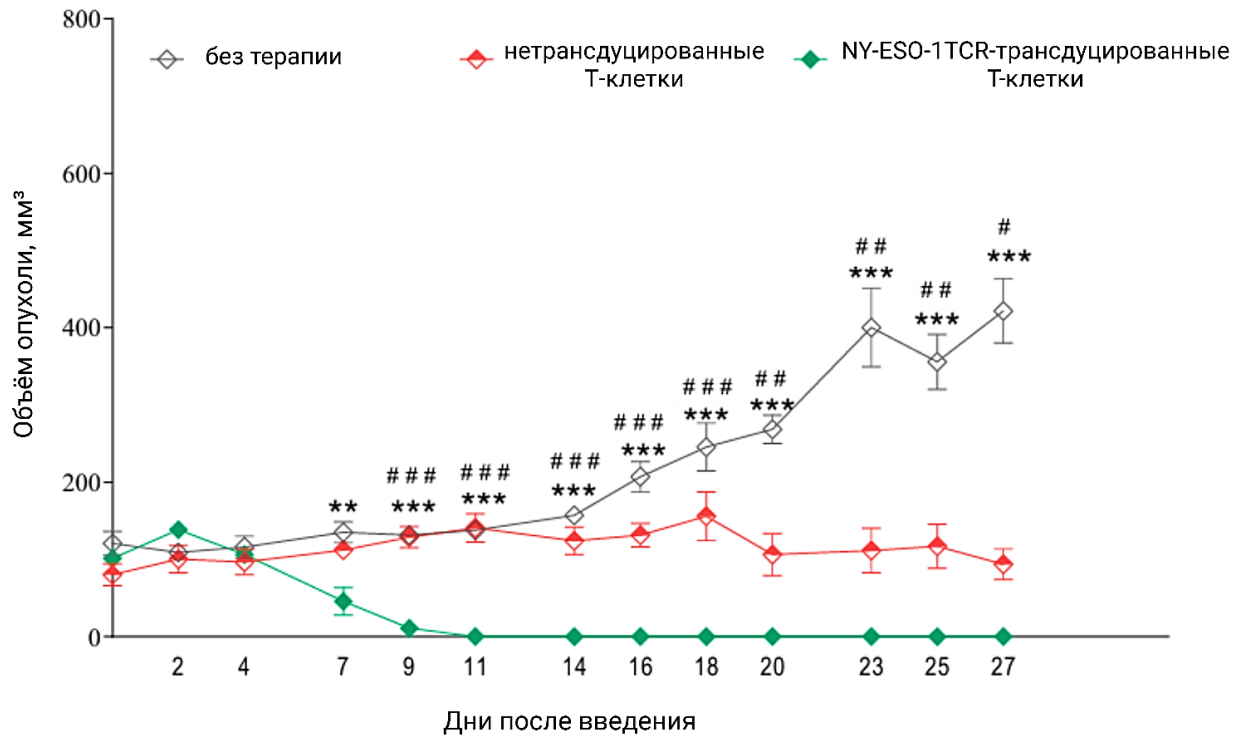


Рисунок 3.11 — Ингибирование роста опухоли Т-клетками, трансдуцированными TCR, специфичными к антигену NY-ESO-1, в модели ксенотрансплантата меланомы. Мышам линии NRG ($n = 24$) подкожно имплантировали клетки опухолевой линии SK-Mel-37 (5×10^6 на мыш). При достижении объема опухоли 80–100 мм³ животным вводили: контрольной группе — нетрансдуцированные Т-клетки, экспериментальной — Т-клетки, трансдуцированные NY-ESO-1-специфичным TCR (8×10^6 клеток на мыш, внутривенно); интактная группа оставалась без лечения. Статистическую значимость различий оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и теста Тьюки для множественных сравнений (two-way ANOVA and Tukey's test for multiple comparisons, $n = 8$ в каждой группе): между экспериментальной и интактной группами (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), экспериментальной и контрольной (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$).

3.8. Детекция NY-ESO-1-специфичных Т-лимфоцитов в периферической крови после инфузии в модели ксенотрансплантата меланомы

На 14-й день после инфузии трансдуцированных Т-клеток у животных экспериментальной группы был произведён забор периферической крови. Для выявления NY-ESO-1-специфичных TCR-T-клеток использовали проточную цитометрию с применением тетрамеров HLA-A*02:01/NY-ESO-1 и антител к человеческому CD3. В качестве контроля использовалась популяция трансдуцированных Т-клеток до инфузии. Результаты показали наличие CD3⁺ тетрамер-позитивных Т-клеток в периферической крови всех животных, что свидетельствует о стабильной экспрессии трансдуцированного TCR *in vivo* на данном этапе наблюдения. Репрезентативная стратегия гейтинга представлена на Рисунок 3.12.

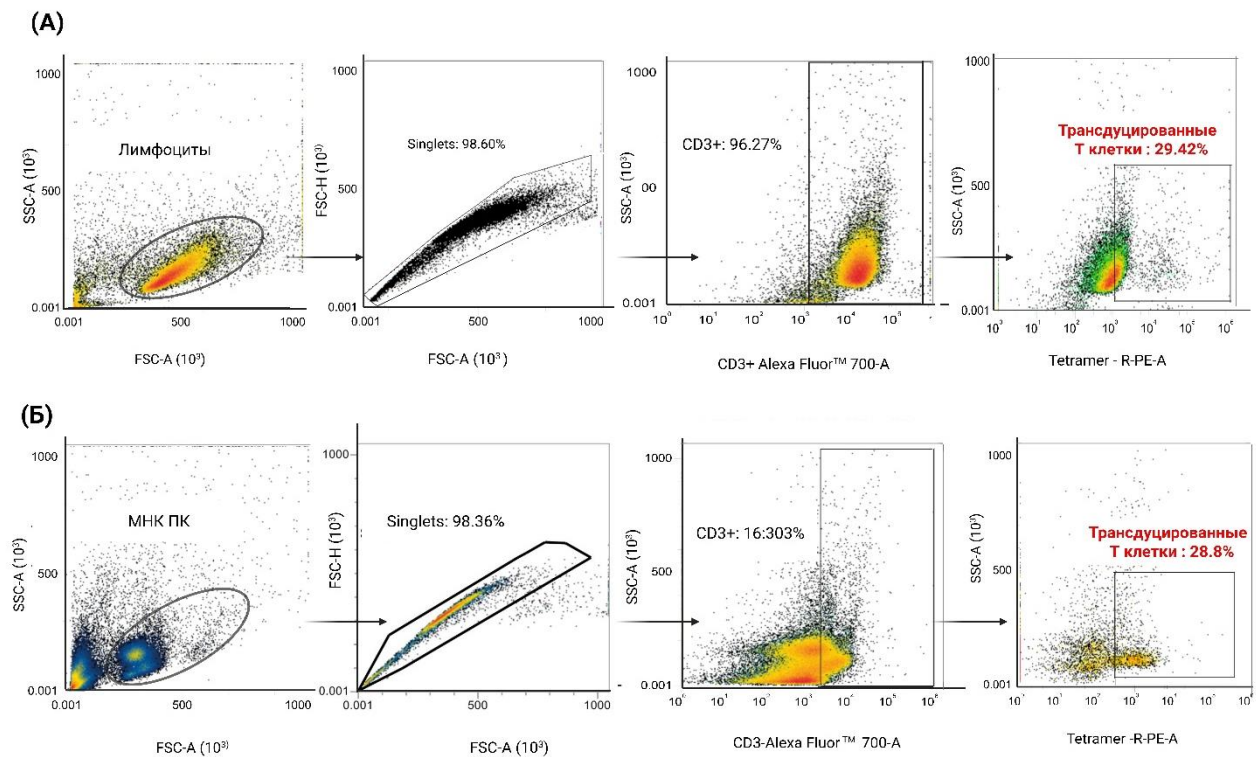


Рисунок 3.12 — Стратегия гейтинга для выявления NY-ESO-1-специфичных TCR-T-клеток в периферической крови экспериментальной группы. (А) Контроль — трансдуцированные Т-клетки до инфузии. (Б) Т-клетки периферической крови мышей на 14-й день после инфузии.

3.9. Одноклеточное транскриптомное профилирование NY-ESO-1-специфичных TCR-модифицированных Т-лимфоцитов в модели ксенотрансплантата меланомы

С целью определения функционального статуса NY-ESO-1-специфичных TCR-трансдуцированных Т-лимфоцитов в модели ксенотрансплантата меланомы SK-Mel-37 было проведено одноклеточное РНК-секвенирование (scRNA-seq). Анализ проводился для двух групп клеток: (1) NY-ESO-1-специфичные TCR-трансдуцированные Т-лимфоциты до введения мышам (Контроль-Т-клетки) и (2) Т-лимфоцитов, выделенных из периферической крови мышей экспериментальной группы на 14-й день после инфузии трансдуцированных клеток (ПК-Т-клетки).

Кластерный анализ экспрессии генов позволил выделить шесть субпопуляций Т-лимфоцитов (Рисунок 3.13А, С): (1) CD4⁺ наивные (CCR7⁺ IL7R⁺), (2) CD8⁺ наивные (CCR7⁺ IL7R⁺), (3) CD4⁺ эффекторные Т-клетки памяти (CD4 EM; CCR7⁻ IL7R^{+/-}), (4) CD8⁺ эффекторные Т-клетки памяти (CD8 EM; CCR7⁻ IL7R^{+/-}), (5) CD8⁺ терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти (CD8 TE; CCR7⁻ IL7R⁻) и (6) пролиферирующие Т-клетки, определённые по экспрессии TYMS — тимидилатсинтазы, ключевого фермента синтеза ДНК, необходимого для пролиферации клеток [252].

В субпопуляциях CD4⁺ EM и CD8⁺ TE выявлена коэкспрессия хемокиновых рецепторов *CCR2* и *CCR5*. Результаты платформы NanoString указывают, что эти клетки представляют собой NY-ESO-1-специфичные TCR-трансдуцированные Т-лимфоциты (Рисунок 3.4).

Количественный анализ субпопуляционного состава выявил статистически значимое увеличение доли эффекторных субпопуляций CD4⁺ EM и CD8⁺ TE в пуле ПК-Т-клеток, при одновременном снижении доли CD8⁺ EM по сравнению с Контроль-Т-клетками (Рисунок 3.13Б).

Дополнительный анализ дифференциальной экспрессии генов подтвердил функциональную перестройку выявленных популяций. Наиболее выраженные изменения были характерны для субпопуляции CD8⁺ TE-клеток, где наблюдалось значительное увеличение уровня экспрессии генов, кодирующих белки, непосредственно ответственные за цитотоксичность: перфорин-1 (*PRF1*), гранзим В (*GZMB*), гранзим Н (*GZMH*) и гранулизин (*GNLY*). Параллельно была зафиксирована повышенная экспрессия генов, характерных для натуральных киллеров (НК-клеток) — *NKG7*, *KLRK1* и *FCGR3A*, — а также гена хемокинового рецептора *CX3CR1* и генов факторов транскрипции (*TBX21*, *PRDM1*). Кроме того, в этой популяции отмечено повышение экспрессии генов ингибиторных рецепторов (*LAG3*, *KLRG1*, *KLRK1*, *CD300A*). Примечательно, что аналогичный, но менее выраженный транскрипционный профиль был выявлен и в субпопуляции CD4⁺ EM-клеток (Рисунок 3.14). В данном кластере

также наблюдалось повышение уровня экспрессии генов цитотоксических молекул (*PRF1*, *GNLY*, *GZMH*, *GZMB*), хемокинового рецептора *CX3CR1*, факторов транскрипции *TBX21* и *PRDM1*, а также ингибиторных рецепторов *LAG3* и *KLRG1* (Рисунок 3.14).

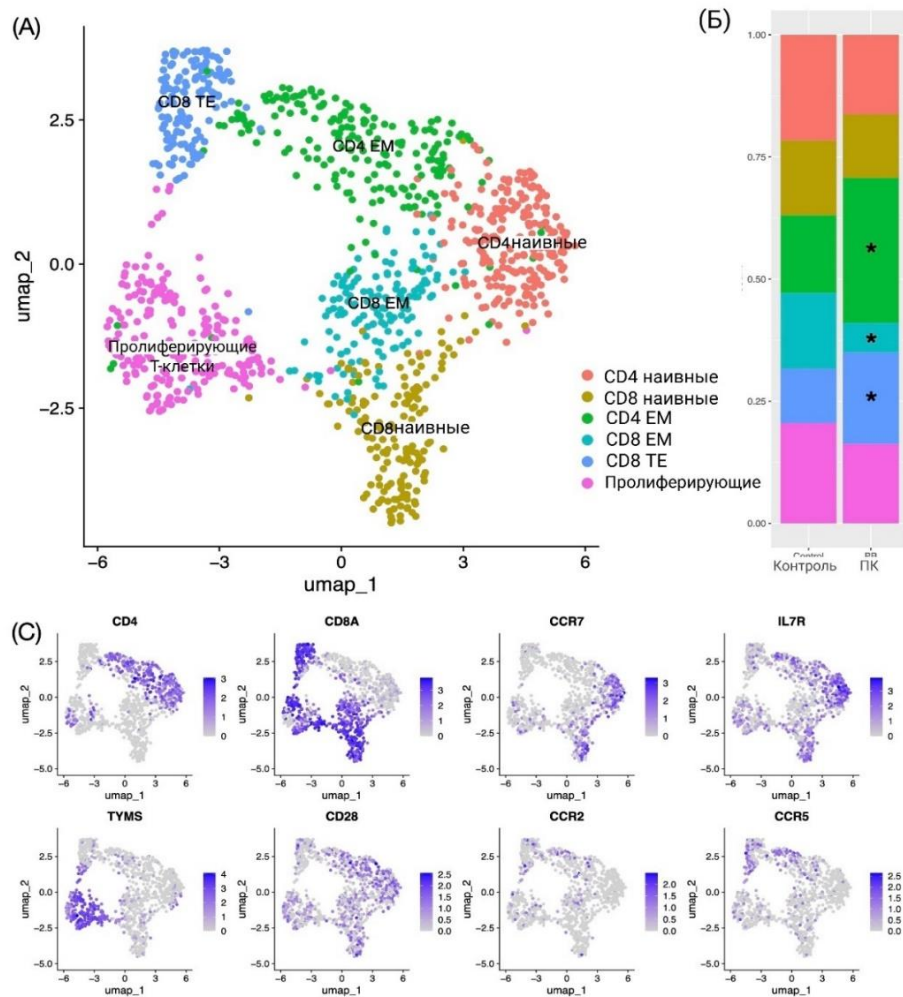


Рисунок 3.13 — Одноклеточный анализ экспрессии генов в NY-ESO-1-специфичных TCR-T-клетках.

(А) Пространственное распределение клеточных кластеров. Точечные графики (UMAP-проекция), отображающие положение отдельных клеток в соответствии с их транскриптомными профилями.

(Б) Количественное распределение Т-клеточных субпопуляций. Столбчатая диаграмма, демонстрирующая процентное соотношение клеток в каждом кластере (данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, $n = 4$). * — статистически значимые изменения ($q < 0,05$). Контроль — Т-клетки, трансдуцированные NY-ESO-1 TCR; ПК — Т-клетки периферической крови через 14 суток после инфузии ($n=4$). (С) Экспрессия кластер-определяющих генов. Интенсивность экспрессии обозначена цветовой шкалой: от серого (минимальная экспрессия) до тёмно-синего (максимальный уровень).

Анализ обогащения наборов генов (GSEA), ассоциированных с повышенной экспрессией в CD8⁺ ТЕ-клетках периферической крови, выявил достоверное обогащение NK-ассоциированных биологических процессов, таких как дегрануляция, цитотоксичность и иммунный ответ (Рисунок 3.15, Таблица 3.3). Эти данные указывают на то, что TCR-трансдуцированные CD8⁺ ТЕ-клетки приобретают цитотоксический профиль, характеризующийся экспрессией генов, типичных для NK-клеток, что подчеркивает их ключевую роль в эффективной элиминации опухолевых клеток *in vivo* [253].

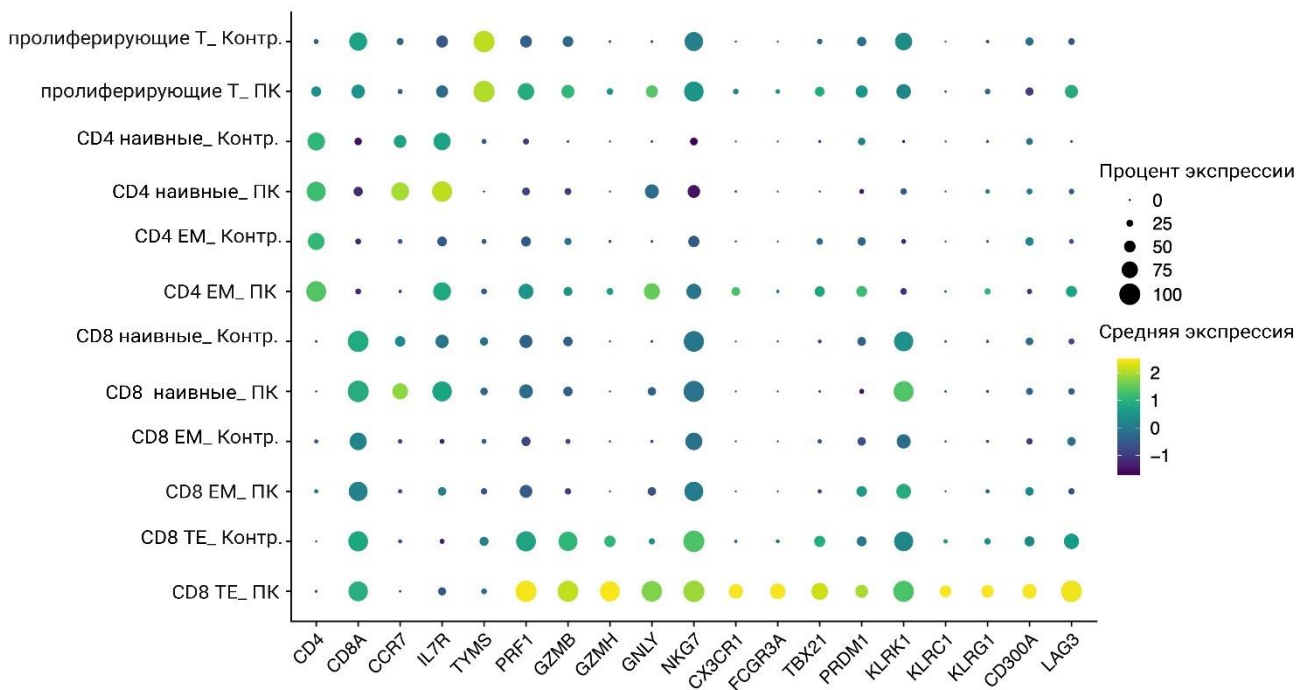


Рисунок 3.14 — Точечный график дифференциальной экспрессии генов в субпопуляциях NY-ESO-1-специфичных TCR-T-клеток. Размер точек пропорционален доле клеток в кластере, экспрессирующей соответствующий ген, а цветовая шкала (Z-оценка) отражает уровень экспрессии: от тёмно-фиолетового (минимум) до жёлтого (максимум). EM – эффекторные T-клетки памяти; TE – терминально-дифференцированные T-клетки памяти; Контроль – T-клетки, трансдуцированные NY-ESO-1 TCR (n = 4); ПК – T-клетки периферической крови через 14 суток после инфузии (n = 4).



Рисунок 3.15 — GSEA-анализ биологических процессов, ассоциированных с повышенной экспрессией генов в CD8⁺ ТЕ-клетках периферической крови. Цвет кругов соответствует степени значимости (желтые оттенки — более значимые), а размер кругов пропорционален доле генов, вовлечённых в соответствующий биологический процесс по данным аннотаций Gene Ontology. Полные результаты приведены в Таблице 3.2.

Таблица 3.3 — Результаты GSEA-анализа биологических процессов, ассоциированных с повышенной экспрессией генов в CD8⁺ ТЕ-клетках периферической крови.

Биологический процесс	Перекрытие (гены)	Комбинированный балл	Основные гены
Дегрануляция NK-клеток	2/5	11441.66	<i>FCGR3A, NKG7</i>
Иммунный ответ, опосредованный NK-клетками	4/22	7409.66	<i>FCGR3A, KLRK1, GZMB, NKG7</i>
Цитотоксичность NK-клеток	4/24	6544.11	<i>FCGR3A, KLRK1, GZMB, NKG7</i>

Биологический процесс	Перекрытие (гены)	Комбинированный балл	Основные гены
Клеточный защитный ответ	4/48	2533.54	<i>CX3CR1, GNLY, PRF1, KLRG1</i>
Негативная регуляция цитотоксичности лейкоцитов	2/14	2335.08	<i>CX3CR1, KLRC1</i>
Активация НК-клеток в иммунном ответе	2/22	1268.18	<i>FCGR3A, NKG7</i>
Сигнальный путь Fc- γ рецепторов	2/24	1129.82	<i>FCGR3A, FYN</i>
Регуляция цитотоксичности НК- клеток	2/32	772.86	<i>KLRK1, KLRC1</i>
Активация НК-клеток	2/45	493.47	<i>FCGR3A, KLRK1</i>
Апоптоз	3/228	146.26	<i>PRF1, GZMB, GZMH</i>

Примечание: $q < 0,01$

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Современные подходы к генетической модификации Т-лимфоцитов открывают принципиально новые возможности для развития адоптивной клеточной терапии, особенно в контексте лечения солидных опухолей, устойчивых к стандартным методам лечения [254, 255]. Несмотря на значительный прогресс в области TCR-Т-клеточной терапии, ключевые аспекты, связанные с оптимизацией функционального состояния генетически модифицированных Т-лимфоцитов, остаются предметом активных исследований. В данной работе основное внимание было уделено комплексной характеристике TCR-модифицированных Т-лимфоцитов, специфичных к раково-тестикулярному антигену NY-ESO-1. Выбор данного антигена обусловлен его высокой иммуногенностью, ограниченной экспрессией в нормальных тканях и значительным клиническим потенциалом, подтвержденным в ряде исследований [13, 15, 256].

Ключевой особенностью исследуемых TCR-модифицированных лимфоцитов являлись аминокислотные замены Gly⁵⁰→Ala и Ala⁵¹→Glu в CDR2-домене β-цепи, оптимизирующие взаимодействие с антигеном за счёт повышения аффинности [102]. Важным аспектом исследования стало детальное изучение функциональных характеристик модифицированных Т-лимфоцитов как *in vitro*, так и *in vivo*. Эти данные являются критически значимыми для разработки эффективных иммунотерапевтических стратегий и их последующей трансляции в клиническую практику.

В конечном счете, все исследования в данной области направлены на решение ключевой задачи — оценки применимости разрабатываемых подходов для адоптивной терапии злокачественных новообразований.

Для генерации NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитов использовался ретровирусный вектор rMS3-NY-ESO-1-TCR, кодирующий α- и β-цепи Т-клеточного рецептора, распознающего эпитоп NY-ESO-1_{157–165} в контексте молекулы HLA-A*02.

Средняя эффективность трансдукции составила $22,13 \pm 7,11$ % ($n = 6$), что свидетельствует об успешном внедрении гена TCR в популяцию Т-лимфоцитов и соответствует параметрам, принятым в клинически ориентированных [257, 258].

Основным фенотипическим маркером, отражающим стадию дифференцировки Т-клеток памяти, является взаимоисключающая экспрессия изоформ CD45RA⁺ и CD45RO⁺ [75]. В связи с этим при фенотипировании клеток памяти, как правило, используют либо маркер CD45RA, либо CD45RO. Для более точной классификации субпопуляций дополнительно применяются молекулы CD62L и CCR7, участвующие в миграции Т-лимфоцитов в лимфоидные органы [75,

82, 259]. При этом важно подчеркнуть, что в настоящее время не существует общепринятых стандартов фенотипической классификации субпопуляций Т-клеток памяти.

В проведённом исследовании NY-ESO-1-специфичные TCR-модифицированные Т-лимфоциты характеризовались преобладанием наивных CD62L⁺CD45RA⁺ Т-клеток, что указывает на их высокий пролиферативный потенциал и способность к длительной персистенции *in vivo* [260]. Наряду с этим, в составе клеточного продукта присутствовали терминально дифференцированные эффекторные клетки памяти (TE, CD62L⁻CD45RA⁺), обладающие способностью к миграции в периферические ткани и быстрому осуществлению цитотоксического ответа [82], что подтверждает функциональную гетерогенность модифицированных Т-клеток. Интересно, что коэкспрессия ингибиторных молекул PD-1 и TIM-3 наблюдалась исключительно в терминально дифференцированных эффекторных популяциях (CD4⁺ TE и CD8⁺ TE), в то время как в наивных Т-клетках коэкспрессии выявлено не было. Хотя PD-1 и TIM-3 являются каноническими маркерами истощения Т-клеток [261, 262], их интерпретация является контекстно-зависимой. Полученные нами данные, демонстрирующие повышение уровня ингибиторных рецепторов по мере дифференцировки, согласуются с появляющимися литературными данными, указывающими на то, что в условиях отсутствия хронического антигенного стимула экспрессия этих молекул в первую очередь отражает степень активации и дифференцировки клеток, а не их функциональное истощение [263].

Особый интерес представляет увеличение доли CD4⁺ Т-лимфоцитов, играющих ключевую роль в регуляции противоопухолевого иммунного ответа. CD4⁺ Т-клетки способны продуцировать IL-2 и IFN- γ — цитокины, критически важные для поддержания пролиферации, выживания и функциональной активности CD8⁺ эффекторных Т-лимфоцитов [264]. Более того, данные клинических исследований свидетельствуют, что высокое соотношение CD4⁺/CD8⁺ в инфузионном продукте положительно коррелирует с клинической эффективностью TCR-Т-клеточной терапии [265–268]. Таким образом, преобладание наивных Т-клеток при одновременном присутствии TE-субпопуляций свидетельствует о формировании сбалансированного клеточного продукта, сочетающего высокий цитотоксический потенциал и способность к формированию долговременной иммунологической памяти, что может способствовать продолжительной персистенции клеток *in vivo*.

С целью более глубокой молекулярной характеристики полученного клеточного продукта был проведён транскриптомный анализ NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитов. Известно, что активация Т-клеток инициирует специфические транскрипционные программы, зависящие от микроокружения, направленные на регуляцию энергетического метаболизма, биосинтеза,

клеточного цикла и дифференцировки [269]. Полученные данные выявили повышение экспрессии генов хемокиновых рецепторов *CCR2* и *CCR5*, играющих ключевую роль в направленной миграции и инфильтрации Т-лимфоцитов в опухолевые ткани [270–272].

Дополнительно было отмечено повышение экспрессии гена *CD96*, ранее ассоциированного с увеличением пула $CD8^+$ Т-лимфоцитов и усилением их цитотоксической активности [273], и *ITGAM* (*CD11b*), вовлечённого в процессы дифференцировки $CD8^+$ Т-клеток и обеспечения их инфильтрации опухоли [274]. Эти изменения свидетельствуют о переходе Т-лимфоцитов в функционально активное состояние. Кроме того, повышение экспрессии гена *TNFSF8* (*CD30L*), характерного преимущественно для активированных $CD4^+$ Т-лимфоцитов, указывает на их участие в поддержке $CD8^+$ эффекторных клеток через *TNFSF8*–*CD30*-опосредованные взаимодействия [275]. Совокупность полученных данных указывает на готовность NY-ESO-1-специфичных ТCR-Т-клеток к реализации эффекторного противоопухолевого ответа.

После кратковременного (2 часа) сокультивирования с опухолевыми клетками линии SK-Mel-37 наблюдалась переориентация транскриптома Т-клеток в сторону эффекторного фенотипа, характерного для антиген-специфической активации. Повышенная экспрессия генов была ассоциирована с ключевыми биологическими процессами, включая сигнальный путь *IFN- γ* [276], регуляцию пролиферации и активации Т-лимфоцитов. Например, усиление экспрессии гена *LTBR*, известного как усилитель функциональной активности Т-клеток и антиген-специфический ответ [277], и *CIQBP*, ассоциированного с митохондриальным окислительным фосфорилированием (*OXPPOS*) [278] и дифференцировкой $CD8^+$ Т-клеток через метаболомико-эпигенетические механизмы [279]. Отдельного внимания заслуживает повышение экспрессии гена *FCGR2A* (*CD32*) в NY-ESO-1-специфичных ТCR-Т-клетках, что указывает на способность клеток взаимодействовать с Fc-фрагментами IgG, потенциально расширяя их функциональный репертуар [280, 281]. Однако для определения клинической значимости этого феномена требуются дальнейшие исследования.

Параллельно наблюдалось снижение экспрессии *CCR7*, *CD62L* и *CD27*, *CD28*, что отражает переход из наивного в эффекторное состояние [282–286]. В частности, быстрое подавление экспрессии *CD62L* (*SELL*), согласно данным Shicheng Yang et al. [287], коррелирует с появлением $CD107a^+$ цитотоксических лимфоцитов. Аналогичная закономерность наблюдалась в популяции NY-ESO-1-TCR Т-клеток (Рисунок 3.8), подтверждая реализацию их цитотоксического потенциала. Также было зафиксировано снижение экспрессии генов, ассоциированных с функцией регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), включая *FOXP3* и *TGFBI* [288, 289], что предполагает возможное снижение иммуносупрессивного потенциала данной популяции.

Дополнительное подтверждение функционального статуса Т-клеток получено при анализе сигнального каскада TCR. Снижение экспрессии генов *ZAP70*, *CD247* (CD3- ζ), *CD4*, *CD8A*, *CD8B* и *LCK* после двухчасового сокультивирования с опухолевыми клетками линии SK-Mel-37 отражает механизмы модуляции TCR-сигналинга, предотвращающие избыточную стимуляцию при сохранении эффекторной функции. Этот феномен, ранее описанный в литературе, реализуется через прерывание передачи сигнала вследствие быстрой деградации *ZAP70*, что ограничивает продолжительность TCR-сигналинга при длительной антигенной стимуляции [290], а также транзиторное подавление экспрессии рецепторов TCR, CD4 и CD8, наблюдаемое в течение первых 4 часов после активации, с последующим восстановлением их экспрессии [291]. В этом контексте, снижение экспрессии компонентов TCR-комплекса может выполнять роль «регулятора темпа» (*pace-maker*), задающего оптимальную частоту взаимодействий TCR с антигеном.

В совокупности транскриптомные изменения демонстрируют способность NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-клеток к координированной регуляции функциональных состояний — миграции, эффекторной дифференцировки и ограничения гиперактивации — с усилением IFN- γ -сигнального пути.

На следующем этапе работы оценивали специфическую цитотоксическую активность NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-клеток *in vitro* по их способности лизировать NY-ESO-1-положительные линии SK-Mel-37 и NW-Mel-38, а также NY-ESO-1-негативную линию HCT-116. В качестве контроля использовали нетрансдуцированные Т-лимфоциты, подвергнутые идентичной стимуляции анти-CD3/IL-2, что позволило исключить влияние неспецифической стимуляционной цитотоксичности на оценку специфичности ответа.

Анализ показал статистически значимое усиление лизиса NY-ESO-1-положительных клеточных линий TCR-Т-клетками по сравнению с контролем. При этом для NY-ESO-1-негативной линии HCT-116 различий между группами выявлено не было.

Полученные данные подтверждают селективность цитотоксического эффекта TCR-Т-клеток и свидетельствуют о его специфическом опосредовании через распознавание антигена NY-ESO-1.

Для уточнения механизмов, лежащих в основе выявленной цитотоксической активности, через 4–5 часов совместной инкубации трансдуцированных Т-клеток с опухолевыми линиями SK-Mel-37 был выполнен многоцветный проточный цитометрический анализ с применением алгоритма HSNE, направленный на характеристику функционального субпопуляционного состава CD8⁺ Т-лимфоцитов — ключевых эффекторов цитотоксического ответа в адоптивной терапии.

Анализ позволил выявить доминирующую субпопуляцию CD8⁺FasL⁺CD107a⁺, характеризующуюся высоким цитотоксическим потенциалом. Экспрессия CD107a (LAMP-1) указывает на активную дегрануляцию и высвобождение цитотоксических гранул [292, 293], тогда как FasL участвует в индукции апоптоза опухолевых клеток через Fas-FasL взаимодействие [294]. Дополнительное функциональное подтверждение активности трансдуцированных TCR-T-клеток было получено в результате анализа секреции цитокинов. Определение оптимального времени для оценки экспрессии цитокинов и цитотоксических молекул осложняется гетерогенностью T-клеточного репертуара и спецификой антигенного стимула [295, 296]. В соответствии с данными литературы [297], оценка функциональной цитотоксичности проводилась через 48 часов сокультивирования, что соответствует кинетике экспрессии гена гранзима В. Результаты анализа продемонстрировали достоверное увеличение уровней гранзимов, гранулина, перфорина и растворимого Fas-лиганда (sFasL), а также провоспалительных цитокинов — TNF, IFN γ , IL17 и IL6 — по сравнению с нетрансдуцированными T-лимфоцитами. Эти данные согласуются с известными механизмами T-клеточной цитотоксичности [298], и подчёркивают высокую степень активации эффекторных функций. Важно отметить, что секреция противовоспалительных цитокинов IL-10 и IL-4 не продемонстрировала значимых различий между группами, что согласуется с транскриптомными данными о снижении экспрессии Treg-ассоциированных генов (*FOXP3*, *TGFBI*) и указывает на уменьшение иммуносупрессивного потенциала данной популяции.

Следующим этапом исследования стала оценка способности NY-ESO-1-TCR-T-клеток индуцировать противоопухолевый ответ *in vivo*. Для этого была использована модель ксенотрансплантата меланомы SK-MEL-37 у иммунодефицитных мышей линии NRG. Внутривенное введение трансдуцированных T-лимфоцитов привело к полной регрессии опухоли к 7-м суткам, тогда как в контрольной группе (нетрансдуцированные T-клетки) наблюдалось лишь статистически значимое замедление роста опухоли, проявившееся с 20-х суток. Эти данные подтверждают высокую специфичность TCR-зависимого механизма подавления NY-ESO-1⁺-опухолей.

Для выявления механизмов терапевтического эффекта был проведён транскриптомный анализ на уровне отдельных клеток (scRNA-seq) периферических T-клеток (ПК-T-клеток), выделенных у животных экспериментальной группы на 14-е сутки после инфузии трансдуцированных T-клеток. Результаты показали достоверное увеличение доли CD4⁺ эффекторных клеток памяти (EM) и CD8⁺ терминально-дифференцированных T-клеток памяти (TE) по сравнению с исходным продуктом трансдукции.

Особый интерес представляет выявление коэкспрессии хемокиновых рецепторов *CCR2* и *CCR5* в субпопуляциях CD4 EM и CD8 TE, что, согласно данным платформы NanoString,

свидетельствует о том, что эти клетки являются NY-ESO-1-специфичными TCR-трансдуцированными Т-лимфоцитами. Эти наблюдения позволяют предположить, что полная регрессия опухоли может быть связана с усиленной миграцией эффекторных лимфоцитов в опухолевую ткань, опосредованной взаимодействием данных рецепторов с их лигандами [270–272].

Наиболее выраженные изменения транскриптома были зафиксированы в CD8 TE-клетках. Установлено, что данные клетки быстро приобретали врожденно-эффекторный/цитотоксический фенотип, характеризующийся повышенной экспрессией генов, кодирующих цитотоксические молекулы (*PRF1*, *GZMB*, *GZMH*, *GZML*), а также экспрессией рецепторов NK-клеток, включая *FCGR3A* (CD16a). Эти данные демонстрируют интеграцию врожденного и адаптивного иммунитета через механизм антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) [299]. Дополнительно была выявлена повышенная экспрессия гена *NKG7*, кодирующего гранулярный белок цитотоксических лимфоцитов. Это может свидетельствовать о его роли в активации и аккумуляции эффекторных CD8⁺ Т-клеток в опухоли [300]. Также наблюдалась повышенная экспрессия гена *KLRK1*, кодирующего рецептор NKG2D, необходимого для опосредованного NK-клетками уничтожения опухолевых клеток через связывание с лигандами MIC, специфически экспрессируемыми при опухолевом или стрессовом состоянии. Это указывает на вовлечённость альтернативных путей распознавания опухоли [301, 302].

Кроме того, выявлено повышение экспрессии гена *KLRC1*, кодирующего ингибиторный рецептор NKG2A. Согласно литературным данным, NKG2A в комплексе с CD94 распознаёт молекулу HLA-E (неклассический представитель молекул MHC I класса) и участвует в процессе иммунного «лицензирования», поддерживая иммунную толерантность [303, 304]. Повышение экспрессии *KLRC1* позволяет предположить вовлечённость HLA-E/NKG2A-опосредованной сигнализации в регуляцию активности NY-ESO-1-TCR CD8⁺ TE-клеток. Эти данные открывают перспективы для применения комбинированных стратегий терапии, включая селективную блокаду NKG2A, эффективность которой при солидных опухолях уже подтверждена (например, применение монализумаба) [305]. Также отмечена повышенная экспрессия гена *KLRG1*, кодирующего NK-рецептор, взаимодействующий с лигандом E-cadherin [306, 307], что может свидетельствовать о его роли в регуляции цитотоксического ответа посредством клеточной адгезии. Наряду с этим была обнаружена активация гена *CD300*, кодирующего рецептор, ингибирующий лизис опухолевых клеток через связывание с фосфатидилсерином (PS) [308], что позволяет предположить существование дополнительного уровня регуляции противоопухолевого ответа. Тем не менее, функциональное значение данных изменений требует дальнейшего изучения.

Повышенная экспрессия транскрипционного фактора *TBX21* (T-bet), ответственного за дифференцировку эффекторных лимфоцитов, вероятно, опосредует усиление цитотоксической активности NY-ESO-1-TCR-T-клеток путём индукции экспрессии генов, кодирующих NK-рецепторы и цитотоксические молекулы (*GZMB* и *PRF1*) [309, 310].

Помимо выраженных изменений в CD8⁺ TE-клетках, single-cell RNA-seq анализ выявил признаки цитотоксической дифференцировки в популяции CD4⁺ EM-клеток. Была обнаружена повышенная экспрессия генов эффекторных молекул (*PRF1*, *GNLY*, *GZMH*, *GZMB*), хотя и значительно менее выраженная, чем в CD8⁺ TE-клетках, что свидетельствует о потенциальной способности к прямому цитолитическому действию [24, 311]. Наблюдаемый цитотоксический профиль, вероятно, был обусловлен высокой аффинностью введенного NY-ESO-1-специфичного TCR, что согласуется с литературными данными о способности высокоаффинных TCR наделять CD4⁺ T-клетки способностью к распознаванию эпитопов в контексте MHC класса I и опосредовать лизис опухолевых клеток независимо от ко-рецептора CD8 [312, 313].

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что к 14-м суткам после инфузии наблюдалась персистенция NY-ESO-1-специфичных CD8⁺ TE-клеток, экспрессирующих гены, характерные как для T-клеточного, так и для NK-клеточного ответа, что свидетельствует о их способности к реализации многофункциональной противоопухолевой активности через TCR-зависимые и TCR-независимые механизмы. Параллельно была идентифицирована популяция CD4⁺ EM-клеток с транскриптомными признаками цитотоксичности, что расширяет потенциальный репертуар эффекторных клеток, способных участвовать в TCR-опосредованном лизисе опухоли.

Однако модель ксенотрансплантата меланомы SK-MEL-37 позволила изолированно исследовать взаимодействие TCR-модифицированных лимфоцитов с опухолью, минимизировав влияние побочных факторов и обеспечив высокое качество транскриптомного анализа, применимого для оценки ранних событий активации и дифференцировки T-клеток. Для подтверждения полученных выводов и их клинической релевантности необходимы дополнительные исследования в иммунокомпетентных моделях [314].

Таким образом, представленные в исследовании подходы обеспечивают генерацию функционально активных NY-ESO-1-специфичных TCR-T-лимфоцитов, способных реализовывать эффективный противоопухолевый ответ. Для оптимизирования противоопухолевой терапии можно выделить два ключевых направления:

1. Комбинирование с ингибиторами контрольных точек (например, блокада KLRC1) для преодоления опухолевой иммуносупрессии в опухолевом микроокружении;

2. Разработка стратегий усиления активации сигнального каскада, ассоциированного с рецепторами NK-клеток, такими как (NKG2D, CD16a), что расширяет арсенал цитотоксических механизмов и способствует усилению противоопухолевого эффекта.

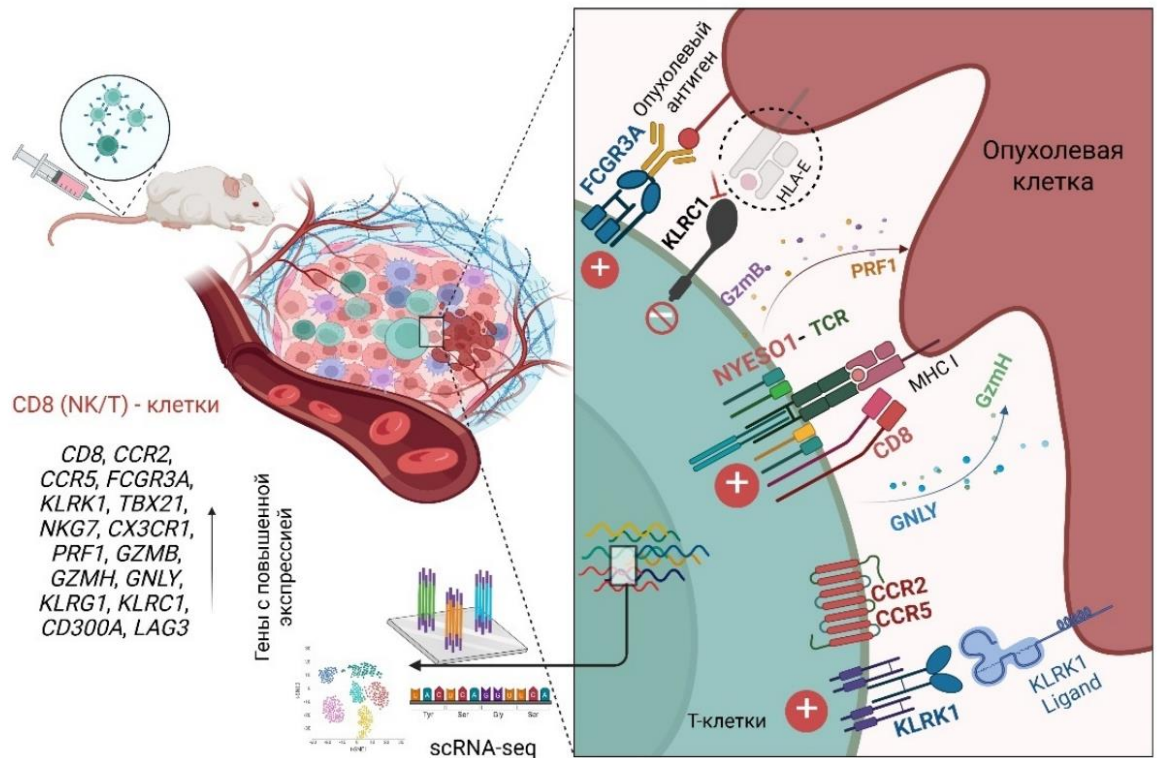


Рисунок 4.1— Гипотетическая модель взаимодействия NY-ESO-1-специфичных CD8⁺ TE-клеток с опухолевыми клетками. На основе данных scRNA-seq предложена модель, демонстрирующая два потенциальных механизма противоопухолевого ответа:

- (1) TCR-зависимый (антиген-специфический) механизм, опосредованный взаимодействием T-клеточного рецептора (TCR) с NY-ESO-1 на поверхности опухолевой клетки.
- (2) TCR-независимый механизм, включающий: антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) через рецептор FCGR3 (CD16); активацию через рецептор KLRK1 (NKG2D), распознающий стресс-индуцированные лиганды на опухолевых клетках; иммунорегуляцию через ингибиторный рецептор KLRC1 (NKG2A), взаимодействующий с HLA-E.

Примечание: Блокада NKG2A рассматривается как перспективный подход для усиления цитотоксической активности T-клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе проведён комплексный анализ функциональных характеристик TCR-модифицированных Т-лимфоцитов, специфичных к опухольассоциированному антигену NY-ESO-1, с целью оценки их противоопухолевого потенциала в модели меланомы как обоснования для дальнейшего применения в адоптивной клеточной терапии солидных новообразований.

Ключевым результатом явилось успешное получение популяции TCR-Т-клеток, трансдуцированных ретровирусным вектором pMS3-NY-ESO-1-TCR, который кодирует α - и β -цепи TCR, специфичные к комплексу NY-ESO-1_{157–165}/HLA-A*02:01.

Фенотипический анализ продемонстрировал функциональную гетерогенность полученного клеточного продукта, представленного доминирующей популяцией наивных CD62L⁺CD45RA⁺ Т-лимфоцитов, а также наличием популяции терминально дифференцированных эффекторных клеток памяти. Установлена четкая зависимость паттерна экспрессии ингибиторных рецепторов от стадии дифференцировки Т-клеток. Коэкспрессия PD-1 и TIM-3 наблюдалась исключительно в терминально дифференцированных эффекторных клетках памяти (CD4⁺ TE и CD8⁺ TE), тогда как в наивных Т-клетках наблюдалась отдельная экспрессия данных молекул.

Транскриптомный анализ выявил активацию генов, ассоциированных с миграцией (*CCR2*, *CCR5*, *ITGAM*) и активацией Т-клеток (*CD96*, *TNFSF8*) в NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитах. Сокультивирование с опухолевыми клетками линии SK-Mel-37 индуцировало транскриптомную перестройку в сторону эффекторного фенотипа, характеризующуюся усилением IFN- γ -сигналинга и снижением экспрессии регуляторных генов (*FOXP3*, *TGFB1*, *CTLA-4*). Параллельно было выявлено подавление экспрессии генов TCR-сигнального комплекса (*ZAP70*, *CD247* (CD3- ζ), *CD4*, *CD8A*, *CD8B* и *LCK*), что свидетельствует об активации механизмов отрицательной регуляции, направленных на контроль избыточной стимуляции Т-клеток *in vitro*.

Функциональная активность TCR-модифицированных Т-клеток была подтверждена *in vitro*: выявлена антиген-специфическая цитотоксичность в отношении NY-ESO-1-положительных опухолевых клеток, сопровождающаяся экспрессией CD107a и FasL на поверхности CD8⁺ Т-лимфоцитов, а также продукцией цитотоксических молекул (гранзимы, гранулизин, перфорин, растворимый Fas-лиганд (sFasL)) и провоспалительных цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17) при отсутствии значимой секреции иммуносупрессивных IL-4 и IL-10.

Введение NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитов в модель ксенотрансплантата меланомы SK-Mel-37 привело к полной регрессии опухоли к седьмым суткам после инфузии. Последующий анализ методом секвенирования одноклеточной РНК (scRNA-seq) на 14-е сутки

продемонстрировал присутствие в периферической крови CD8⁺ TE-клеток, экспрессирующих гены цитотоксических молекул (*PRF1*, *GZMB*, *GZMH* *GNLY*) и рецепторов, характерных для НК-клеток (*KLRK1*, *FCGR3A*, *NKG7*), а также CD4⁺ EM-клеток с экспрессией маркеров цитотоксической активности.

Транскриптомный профиль выявленных клеток указывает на потенциальное наличие двойного механизма противоопухолевого действия: TCR-зависимого (антиген-специфического) и TCR-независимого, потенциально опосредованного экспрессией рецепторов врождённого иммунитета. Полученные данные подчёркивают перспективность дальнейшей разработки терапевтических стратегий, направленных на использование Т-лимфоцитов с интеграцией свойств врождённого и адаптивного иммунного ответа.

ВЫВОДЫ

1. Метод ретровирусной трансдукции с использованием вектора, кодирующего оптимизированные α - и β -цепи Т-клеточного рецептора (TCR), специфичного к комплексу NY-ESO-1_{157–165}/HLA-A*02:01, позволяет получать популяцию генетически модифицированных NY-ESO-1-TCR-Т-клеток с эффективностью трансдукции $22,13 \pm 7,11$ % и жизнеспособностью более 95%.

2. Полученная популяция TCR-модифицированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, распознающих эпитоп NY-ESO-1, преимущественно состоит из наивных клеток (CD62L⁺CD45RA⁺) и терминально дифференцированных эффекторных клеток памяти (CD62L⁻CD45RA⁺), что свидетельствует о наличии клеток с потенциалом к длительной персистенции и клеток, готовых к немедленному эффекторному ответу.

3. В NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитах выявлено повышение экспрессии генов, кодирующих хемокиновые рецепторы и молекулы, участвующие в активации Т-клеток (*CCR2*, *CCR5*, *CD96*, *TNFSF8*, *ITGAM*), а совместное культивирование с NY-ESO-1-положительными опухолевыми клетками индуцирует повышение экспрессии генов IFN- γ -сигнального пути при одновременном снижении экспрессии регуляторных генов (*FOXP3*, *TGFB1*, *CTLA-4*), что свидетельствует о дифференцировке клеток в сторону эффекторного фенотипа с позитивной регуляцией Т-клеточного ответа.

4. NY-ESO-1-специфичные TCR-модифицированные Т-лимфоциты проявляют антиген-специфическую цитотоксичность в отношении NY-ESO-1-положительной клеточной линии SK-Mel-37, сопровождающуюся повышением экспрессии маркера дегрануляции CD107a и лиганда FasL, а также увеличением продукции гранзимов, гранулизина, перфорина, IFN- γ , TNF- α , sFasL и интерлейкинов IL-6 и IL-17, что свидетельствует об активации перфорин-гранзимового, Fas/FasL-опосредованного и цитокин-зависимого механизмов цитотоксичности.

5. Введение NY-ESO-1-TCR-Т-лимфоцитов в модели ксенотрансплантата клеток меланомы SK-Mel-37 у иммунодефицитных мышей линии NRG приводит к полной регрессии опухоли к 7-м суткам. На 14-е сутки в периферической крови выявлены циркулирующие трансдуцированные TCR-Т-клетки: терминально дифференцированные эффекторные CD8⁺ Т-клетки памяти с высокой экспрессией цитотоксических молекул (*PRF1*, *GZMB*, *GZMH*, *GNLY*), рецепторов NK-клеток (*KLRK1*, *FCGR3A*, *NKG7*) и ингибиторных молекул (*KLRC1*, *KLRG1*, *CD300A*, *LAG3*), а также CD4⁺ эффекторные Т-клетки памяти с экспрессией маркеров

цитотоксической активности (*PRF1*, *GNLY*, *GZMB*, *GZMH*), что свидетельствует об их участии в противоопухолевом иммунном ответе.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АКТ** — адоптивная клеточная терапия
- АПК** — антиген-презентирующая клетка
- МНК ПК** — моноклеарные клетки периферической крови
- ЦТЛ** — цитотоксический Т-лимфоцит
- CAR** — химерный антигенный рецептор (англ. chimeric antigen receptor)
- CCR** — рецептор хемокинов типа C–C (англ. C–C chemokine receptor)
- CD** — кластер дифференцировки (англ. cluster of differentiation)
- CDR** — комплементарно-определяющий регион (англ. complement-determining region)
- C1QB_P** — белок-связывающий субъединицу C1q комплемента (англ. complement component 1 Q subcomponent-binding protein)
- CTAs** — раково-тестикулярные антигены (англ. cancer-testis antigens)
- ЕМ** — эффекторные клетки памяти (англ. effector memory cells)
- FAS** — рецептор Fas (англ. Fas receptor)
- FASL** — лиганд Fas (англ. Fas ligand)
- FcR** — рецептор к Fc-фрагменту иммуноглобулина (англ. fragment crystallizable receptor)
- FOXP3** — фактор транскрипции FOXP3 (англ. forkhead box P3)
- G50A+A51E** (Gly⁵⁰→Ala и Ala⁵¹→Glu) — замены аминокислот глицин → аланин (в позиции 50) и аланин → глутаминовая кислота (в позиции 51)
- GNLY** — гранулизин (англ. Granulysin)
- GZM** — гранзим (англ. granzyme)
- HLA** — антигены тканевой совместимости (англ. human leukocyte antigen)
- IFN** — интерферон (англ. interferon)
- IL** — интерлейкин (англ. interleukin)
- IRF** — интерферон-регулирующий фактор (англ. interferon responding factor)
- KLR** — лектиноподобный рецептор киллерных клеток (англ. killer cell lectin-like receptor)
- LAG3** — лимфоцитарный активирующий ген-3 (англ. lymphocyte-activation gene 3)
- Lck** — лимфоцит-специфическая протеинкиназа (англ. lymphocyte-specific protein tyrosine kinase)
- LTBR** — рецептор лимфотоксина β (англ. lymphotoxin beta receptor)
- МНС-I** — главный комплекс гистосовместимости I класса (англ. major histocompatibility complex class I)
- НК** — натуральные киллеры (англ. natural killer cells)

- NKG2**— лектиноподобные рецепторы группы натуральных киллеров (англ. natural killer group 2)
- NKG7** — гранулярный белок NK-клеток (англ. natural killer cell granule protein 7)
- NY-ESO-1** — раково-тестикулярный антиген, впервые выделенный из плоскоклеточной карциномы пищевода в Нью-Йорке (англ. New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma 1)
- PD-1** — программируемый рецептор смерти-1 (англ. programmed cell death protein 1)
- PRF1** — перфорин-1 (англ. perforin 1)
- scRNA-seq** — секвенирование РНК на уровне одной клетки (англ. single-cell RNA sequencing)
- SELL (CD62L)** — L-селектин (англ. L-selectin)
- TCR** — Т-клеточный рецептор (англ. T cell receptor)
- TGF** — трансформирующий фактор роста (англ. transforming growth factor)
- TIL** — опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (англ. tumor-infiltrating lymphocytes)
- TE** — терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти (англ. terminal effector memory T cells)
- TBX21 (T-bet)** — транскрипционный фактор T-bet (англ. T-box transcription factor 21)
- TIM-3** — иммунорегуляторный рецептор TIM-3 (англ. T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3)
- TNF** — фактор некроза опухоли (англ. tumor necrosis factor)
- Zap** — зета-цепь-ассоциированная протеинкиназа (англ. ζ -associated protein kinase)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sung H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // *CA. Cancer J.* — 2021. — Vol. 71. — № 3. — P. 209–249.
2. Knight R. et al. Global variation in postoperative mortality and complications after cancer surgery: a multicentre, prospective cohort study in 82 countries // *The Lancet.* — 2021. — Vol. 397. — № 10272. — P. 387–397.
3. Albano D. et al. Imaging side effects and complications of chemotherapy and radiation therapy: a pictorial review from head to toe // *Insights Imaging.* — 2021. — Vol. 12. — № 1. — P. 76.
4. Orzetti S. et al. Genetic Therapy and Molecular Targeted Therapy in Oncology: Safety, Pharmacovigilance, and Perspectives for Research and Clinical Practice // *International Journal of Molecular Sciences.* — 2022. — Vol. 23. — № 6 — P. 3012.
5. Papaioannou N.E. et al. Harnessing the immune system to improve cancer therapy // *Annals of Translational Medicine.* — 2016. — Vol. 4. — № 14. — P. 261.
6. Paijens S.T. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era // *Cellular & Molecular Immunology.* — 2021. — Vol. 18. — № 4. — P. 842–859.
7. Guedan S., Ruella M., June C.H. Emerging Cellular Therapies for Cancer // *Annual Review of Immunology.* — 2019. — Vol. 37. — P. 145–171.
8. Edes I. et al. TCR and CAR Engineering of Primary Human T Cells // *Methods in molecular biology.* — 2022. — Vol. 2521— P. 85–93.
9. Hong M., Clubb J.D., Chen Y.Y. Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy // *Cancer Cell.* — 2020. — Vol. 38. — № 4. — P. 473–488.
10. Flugel C.L. et al. Overcoming on-target, off-tumour toxicity of CAR T cell therapy for solid tumours // *Nature Reviews Clinical Oncology.* — 2023. — Vol. 20. — № 1. — P. 49–62.
11. Hiltensperger M., Krackhardt A.M. Current and future concepts for the generation and application of genetically engineered CAR-T and TCR-T cells // *Frontiers in Immunology.* — 2023. — Vol. 14. — P. 1121030.
12. Zhao X., Shao S., Hu L. The recent advancement of TCR-T cell therapies for cancer treatment // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* — 2024. — Vol. 56. — № 5. — P. 663–674.
13. Thomas R. et al. NY-ESO-1 Based Immunotherapy of Cancer: Current Perspectives // *Frontiers*

- in Immunology. — 2018. — Vol. 9. — P. 947.
14. Stockert E. et al. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens // *Journal of Experimental Medicine*. — 1998. — Vol. 187. — № 8. — P. 1349–1354.
 15. Alsalloum A., Shevchenko J.A., Sennikov S. NY-ESO-1 antigen: A promising frontier in cancer immunotherapy // *Clinical and Translational Medicine*. — 2024. — Vol. 14. — № 9. — P. e70020.
 16. Robbins P.F. et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1 // *Journal of clinical oncology*. — 2011. — Vol. 29. — № 7. — P. 917–924.
 17. Robbins P.F. et al. A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response // *Clinical cancer research*. — 2015. — Vol. 21. — № 5. — P. 1019–1027.
 18. Huang D. et al. Advances in single-cell RNA sequencing and its applications in cancer research // *J. Hematol. Oncol.* — 2023. — Vol. 16. — № 1. — P. 98.
 19. Gohil S.H. et al. Applying high-dimensional single-cell technologies to the analysis of cancer immunotherapy // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* — 2021. — Vol. 18. — № 4. — P. 244–256.
 20. Villani AC., Shekhar K. Single-Cell RNA Sequencing of Human T Cells // *Methods Mol. Biol.* — 2017. — Vol. 1514. — P. 203–239.
 21. Koebel C.M. et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state // *Nature*. — 2007. — Vol. 450. — № 7171. — P. 903–907.
 22. Khong H.T., Restifo N.P. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes // *Nat. Immunol.* — 2002. — Vol. 3. — № 11. — P. 999–1005.
 23. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation // *Cell*. — 2011. — Vol. 144. — № 5. — P. 646–674.
 24. Cenerenti M. et al. The Era of Cytotoxic CD4 T Cells // *Front. Immunol.* — 2022. — Vol. 13. — P. 867189.
 25. Raskov H. et al. Cytotoxic CD8(+) T cells in cancer and cancer immunotherapy // *Br. J. Cancer*. — 2021. — Vol. 124. — № 2. — P. 359–367.
 26. Chen D.S., Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle // *Immunity*. — 2013. — Vol. 39. — № 1. — P. 1–10.
 27. Speiser D.E., Ho P.-C., Verdeil G. Regulatory circuits of T cell function in cancer // *Nat. Rev.*

- Immunol. — 2016. — Vol. 16. — № 10. — P. 599–611.
28. Wang L. et al. Hot and cold tumors: Immunological features and the therapeutic strategies // *MedComm*. — 2023. — Vol. 4. — № 5. — P. e343.
 29. Coulie P.G. et al. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy // *Nat. Rev. Cancer*. — 2014. — Vol. 14. — № 2. — P. 135–146.
 30. Fu C., Jiang A. Dendritic Cells and CD8 T Cell Immunity in Tumor Microenvironment // *Front. Immunol.* — 2018. — Vol. 9. — P. 3059.
 31. Brazin K.N. et al. Structural Features of the $\alpha\beta$ TCR Mechanotransduction Apparatus That Promote pMHC Discrimination // *Front. Immunol.* — 2015. — Vol. 6. — P. 441.
 32. Dustin M.L. The immunological synapse // *Cancer Immunol. Res.* — 2014. — Vol. 2. — № 11. — P. 1023–1033.
 33. Chen L., Flies D.B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition // *Nat. Rev. Immunol.* — 2013. — Vol. 13. — № 4. — P. 227–242.
 34. Schoenberger S.P. et al. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions // *Nature*. — 1998. — Vol. 393. — № 6684. — P. 480–483.
 35. Speiser D.E. et al. CD4(+) T cells in cancer // *Nat. cancer*. — 2023. — Vol. 4. — № 3. — P. 317–329.
 36. Ferris S.T. et al. cDC1 prime and are licensed by CD4(+) T cells to induce anti-tumour immunity // *Nature*. — 2020. — Vol. 584. — № 7822. — P. 624–629.
 37. Gottschalk C., Mettke E., Kurts C. The Role of Invariant Natural Killer T Cells in Dendritic Cell Licensing, Cross-Priming, and Memory CD8(+) T Cell Generation // *Front. Immunol.* — 2015. — Vol. 6. — P. 379.
 38. Srivastava R.M. et al. Cetuximab-Activated Natural Killer and Dendritic Cells Collaborate to Trigger Tumor Antigen-Specific T-cell Immunity in Head and Neck Cancer Patients // *Clin. Cancer Res.* — 2013. — Vol. 19. — № 7. — P. 1858–1872.
 39. Bettini M.L. et al. Membrane association of the CD3 ϵ signaling domain is required for optimal T cell development and function // *J. Immunol.* — 2014. — Vol. 193. — № 1. — P. 258–267.
 40. Furlan G. et al. Phosphatase CD45 both positively and negatively regulates T cell receptor phosphorylation in reconstituted membrane protein clusters // *J. Biol. Chem.* — 2014. — Vol. 289. — № 41. — P. 28514–28525.
 41. Ngoenkam J., Schamel W.W., Pongcharoen S. Selected signalling proteins recruited to the T-cell receptor-CD3 complex // *Immunology*. — 2018. — Vol. 153. — № 1. — P. 42–50.

42. Garcia K.C. et al. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes // *Nature*. — 1996. — Vol. 384. — № 6609. — P. 577–581.
43. Valitutti S. et al. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes // *Nature*. — 1995. — Vol. 375. — № 6527. — P. 148–151.
44. Borovsky Z. et al. Serial triggering of T cell receptors results in incremental accumulation of signaling intermediates // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277. — № 24. — P. 21529–21536.
45. Zumerle S., Molon B., Viola A. Membrane Rafts in T Cell Activation: A Spotlight on CD28 Costimulation // *Front. Immunol.* — 2017. — Vol. 8. — P. 1467.
46. Faia K. et al. The phosphoinositide-3 kinase (PI3K)- δ,γ inhibitor, duvelisib shows preclinical synergy with multiple targeted therapies in hematologic malignancies // *PLoS One*. — 2018. — Vol. 13. — № 8. — P. e0200725.
47. Basu R. et al. Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to Potentiate Target Cell Killing // *Cell*. — 2016. — Vol. 165. — № 1. — P. 100–110.
48. Gordy C., He Y.-W. Endocytosis by target cells: an essential means for perforin- and granzyme-mediated killing // *Cell. Mol. Immunol.* — 2012. — Vol. 9. — № 1. — P. 5–6.
49. Peters P.J. et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes // *J. Exp. Med.* — 1991. — Vol. 173. — № 5. — P. 1099–1109.
50. Fu Q. et al. Structural Basis and Functional Role of Intramembrane Trimerization of the Fas/CD95 Death Receptor // *Mol. Cell*. — 2016. — Vol. 61. — № 4. — P. 602–613.
51. Mitra R., Singh S., Khar A. Antitumour immune responses // *Expert reviews in molecular medicine*. — 2003. — Vol. 5. — № 3. — P. 1–19.
52. Wiedemann A. et al. Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2006. — Vol. 103. — № 29. — P. 10985–10990.
53. Khazen R. et al. Melanoma cell lysosome secretory burst neutralizes the CTL-mediated cytotoxicity at the lytic synapse // *Nat. Commun.* — 2016. — Vol. 7. — P. 10823.
54. Dornmair K. et al. T-cell-mediated autoimmunity: novel techniques to characterize autoreactive T-cell receptors // *Am. J. Pathol.* — 2003. — Vol. 163. — № 4. — P. 1215–1226.
55. Shevchenko I., Bazhin A. V. Metabolic Checkpoints: Novel Avenues for Immunotherapy of Cancer // *Front. Immunol.* — 2018. — Vol. 9. — P. 1816.
56. Vodnala S.K. et al. T cell stemness and dysfunction in tumors are triggered by a common mechanism // *Science*. — 2019. — Vol. 363. — № 6434. — P. eaau0135.

57. Angelosanto J.M. et al. Progressive loss of memory T cell potential and commitment to exhaustion during chronic viral infection // *J. Virol.* — 2012. — Vol. 86. — № 15. — P. 8161–8170.
58. Thommen D.S. et al. Progression of Lung Cancer Is Associated with Increased Dysfunction of T Cells Defined by Coexpression of Multiple Inhibitory Receptors // *Cancer Immunol. Res.* — 2015. — Vol. 3. — № 12. — P. 1344–1355.
59. Li H. et al. Dysfunctional CD8 T Cells Form a Proliferative, Dynamically Regulated Compartment within Human Melanoma // *Cell.* — 2019. — Vol. 176. — № 4. — P. 775-789.e18.
60. Havel J.J., Chowell D., Chan T.A. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy // *Nat. Rev. Cancer.* — 2019. — Vol. 19. — № 3. — P. 133–150.
61. Carpenter A.C., Bosselut R. Decision checkpoints in the thymus // *Nat. Immunol.* — 2010. — Vol. 11. — № 8. — P. 666–673.
62. Yoon H., Kim T.S., Braciale T.J. The cell cycle time of CD8⁺ T cells responding in vivo is controlled by the type of antigenic stimulus // *PLoS One.* — 2010. — Vol. 5. — № 11. — P. e15423.
63. Lewis D.A., Ly T. Cell Cycle Entry Control in Naïve and Memory CD8(+) T Cells // *Front. cell Dev. Biol.* — 2021. — Vol. 9. — P. 727441.
64. Mehlhop-Williams E.R., Bevan M.J. Memory CD8⁺ T cells exhibit increased antigen threshold requirements for recall proliferation // *J. Exp. Med.* — 2014. — Vol. 211. — № 2. — P. 345–356.
65. Farber D.L., Yudanin N.A., Restifo N.P. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis // *Nat. Rev. Immunol.* — 2014. — Vol. 14. — № 1. — P. 24–35.
66. Martin M.D., Badovinac V.P. Defining Memory CD8 T Cell // *Front. Immunol.* — 2018. — Vol. 9. — P. 2692.
67. Gattinoni L. et al. T memory stem cells in health and disease // *Nat. Med.* — 2017. — Vol. 23. — № 1. — P. 18–27.
68. Wherry E.J. et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets // *Nat. Immunol.* — 2003. — Vol. 4. — № 3. — P. 225–234.
69. Lanzavecchia A., Sallusto F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response // *Nat. Rev. Immunol.* — 2002. — Vol. 2. — № 12. — P. 982–987.
70. Gett A. V. et al. T cell fitness determined by signal strength // *Nat. Immunol.* — 2003. — Vol. 4. — № 4. — P. 355–360.

71. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance // *Annu. Rev. Immunol.* — 2004. — Vol. 22. — P. 745–763.
72. Chang J.T. et al. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses // *Science.* — 2007. — Vol. 315. — № 5819. — P. 1687–1691.
73. Lugli E. et al. Superior T memory stem cell persistence supports long-lived T cell memory // *J. Clin. Invest.* — 2013. — Vol. 123. — № 2. — P. 594–599.
74. Gattinoni L. et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties // *Nat. Med.* — 2011. — Vol. 17. — № 10. — P. 1290–1297.
75. Mahnke Y.D. et al. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets // *Eur. J. Immunol.* — 2013. — Vol. 43. — № 11. — P. 2797–2809.
76. Gunn M.D. et al. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 1998. — Vol. 95. — № 1. — P. 258–263.
77. Campbell J.J. et al. Chemokines and the Arrest of Lymphocytes Rolling Under Flow Conditions // *Science.* — 1998. — Vol. 279. — № 5349. — P. 381–384.
78. Campbell J.J. et al. 6-C-kine (SLC), a Lymphocyte Adhesion-triggering Chemokine Expressed by High Endothelium, Is an Agonist for the MIP-3 β Receptor CCR7 // *J. Cell Biol.* — 1998. — Vol. 141. — № 4. — P. 1053–1059.
79. Mackay C.R., Marston W.L., Dudler L. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation // *J. Exp. Med.* — 1990. — Vol. 171. — № 3. — P. 801–817.
80. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic // *Nature.* — 1998. — Vol. 392. — № 6676. — P. 565–568.
81. Butcher E.C., Picker L.J. Lymphocyte Homing and Homeostasis // *Science.* — 1996. — Vol. 272. — № 5258. — P. 60–66.
82. Sallusto F. et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions // *Nature.* — 1999. — Vol. 401. — № 6754. — P. 708–712.
83. Champagne P. et al. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes // *Nature.* — 2001. — Vol. 410. — № 6824. — P. 106–111.
84. Ellefsen K. et al. Distribution and functional analysis of memory antiviral CD8 T cell responses in HIV-1 and cytomegalovirus infections // *Eur. J. Immunol.* — 2002. — Vol. 32. — № 12. — P. 3756–3764.

85. Pédrón B. et al. Development of cytomegalovirus and adenovirus-specific memory CD4 T-cell functions from birth to adulthood // *Pediatr. Res.* — 2011. — Vol. 69. — № 2. — P. 106–111.
86. Wang A. et al. The stoichiometric production of IL-2 and IFN- γ mRNA defines memory T cells that can self-renew after adoptive transfer in humans // *Sci. Transl. Med.* — 2012. — Vol. 4. — № 149. — P. 149ra120.
87. Fearon D.T. et al. The rationale for the IL-2-independent generation of the self-renewing central memory CD8⁺ T cells // *Immunol. Rev.* — 2006. — Vol. 211. — P. 104–118.
88. Zhang Y. et al. Host-reactive CD8⁺ memory stem cells in graft-versus-host disease // *Nat. Med.* — 2005. — Vol. 11. — № 12. — P. 1299–1305.
89. Schluns K.S. et al. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo // *Nat. Immunol.* — 2000. — Vol. 1. — № 5. — P. 426–432.
90. Joshi N.S. et al. Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8⁺ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor // *Immunity.* — 2007. — Vol. 27. — № 2. — P. 281–295.
91. Hand T.W., Morre M., Kaech S.M. Expression of IL-7 receptor α is necessary but not sufficient for the formation of memory CD8 T cells during viral infection // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2007. — Vol. 104. — № 28. — P. 11730–11735.
92. Henson S.M., Riddell N.E., Akbar A.N. Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA re-expression // *Curr. Opin. Immunol.* — 2012. — Vol. 24. — № 4. — P. 476–481.
93. Brummelman J., Pilipow K., Lugli E. Chapter Two - The Single-Cell Phenotypic Identity of Human CD8⁺ and CD4⁺ T Cells // *Int Rev Cell Mol Biol.* — 2018. — Vol. 341. — P. 63–124.
94. Ando M. et al. Memory T cell, exhaustion, and tumor immunity // *Immunol. Med.* — 2020. — Vol. 43. — № 1. — P. 1–9.
95. Chan J.D. et al. Cellular networks controlling T cell persistence in adoptive cell therapy // *Nat. Rev. Immunol.* — 2021. — Vol. 21. — № 12. — P. 769–784.
96. Masopust D. et al. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue // *Science.* — 2001. — Vol. 291. — № 5512. — P. 2413–2417.
97. Schenkel J.M., Masopust D. Tissue-Resident Memory T Cells // *Immunity.* — 2014. — Vol. 41. — № 6. — P. 886–897.
98. Rosenberg S.A. et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report // *N. Engl. J. Med.* — 1988. — Vol. 319. — № 25. — P. 1676–1680.

99. Chandran S.S., Klebanoff C.A. T cell receptor-based cancer immunotherapy: Emerging efficacy and pathways of resistance // *Immunol. Rev.* — 2019. — Vol. 290. — № 1. — P. 127–147.
100. Fernández-Quintero M.L., Seidler C.A., Liedl K.R. T-Cell Receptor Variable β Domains Rigidify During Affinity Maturation // *Sci. Rep.* — 2020. — Vol. 10. — № 1. — P. 4472.
101. Stone J.D., Chervin A.S., Kranz D.M. T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity // *Immunology.* — 2009. — Vol. 126. — № 2. — P. 165–176.
102. Robbins P.F. et al. Single and dual amino acid substitutions in TCR CDRs can enhance antigen-specific T cell functions // *J. Immunol.* — 2008. — Vol. 180. — № 9. — P. 6116–6131.
103. Li Y. et al. Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display // *Nat. Biotechnol.* — 2005. — Vol. 23. — № 3. — P. 349–354.
104. Hebeisen M. et al. Identifying Individual T Cell Receptors of Optimal Avidity for Tumor Antigens // *Front. Immunol.* — 2015. — Vol. 6. — P. 582.
105. Abate-Daga D., Davila M.L. CAR models: next-generation CAR modifications for enhanced T-cell function // *Mol. Ther. oncolytics.* — 2016. — Vol. 3. — P. 16014.
106. Robinson J. et al. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases // *Nucleic Acids Res.* — 2015. — Vol. 43. — № Database issue. — P. D423–D431.
107. Gonzalez-Galarza F.F. et al. Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools // *Nucleic Acids Res.* — 2020. — Vol. 48. — № D1. — P. D783–D788.
108. Uhlén M. et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome // *Science.* — 2015. — Vol. 347. — № 6220. — P. 1260419.
109. Bausch-Fluck D. et al. The in silico human surfaceome // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2018. — Vol. 115. — № 46. — P. E10988–E10997.
110. Fagerberg L. et al. Prediction of the human membrane proteome // *Proteomics.* — 2010. — Vol. 10. — № 6. — P. 1141–1149.
111. Harris D.T. et al. Comparison of T Cell Activities Mediated by Human TCRs and CARs That Use the Same Recognition Domains // *J. Immunol.* — 2018. — Vol. 200. — № 3. — P. 1088–1100.
112. Salter A.I. et al. Comparative analysis of TCR and CAR signaling informs CAR designs with superior antigen sensitivity and in vivo function // *Sci. Signal.* — 2021. — Vol. 14. — № 697. — P. eabe2606.
113. Ramello M.C. et al. An immunoproteomic approach to characterize the CAR interactome and signalosome // *Sci. Signal.* — 2019. — Vol. 12. — № 568. — P. aap9777.

114. Majzner R.G., Mackall C.L. Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy // *Cancer Discov.* — 2018. — Vol. 8. — № 10. — P. 1219–1226.
115. Frey N., Porter D. Cytokine Release Syndrome with Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy // *Biol. blood marrow Transplant.* — 2019. — Vol. 25. — № 4. — P. e123–e127.
116. Watanabe K. et al. Expanding the Therapeutic Window for CAR T Cell Therapy in Solid Tumors: The Knowns and Unknowns of CAR T Cell Biology // *Front. Immunol.* — 2018. — Vol. 9. — P. 2486.
117. Lythe G. et al. How many TCR clonotypes does a body maintain? // *J. Theor. Biol.* — 2016. — Vol. 389. — P. 214–224.
118. Tran E. et al. T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer // *N. Engl. J. Med.* — 2016. — Vol. 375. — № 23. — P. 2255–2262.
119. Lu Y.-C. et al. An Efficient Single-Cell RNA-Seq Approach to Identify Neoantigen-Specific T Cell Receptors // *Mol. Ther.* — 2018. — Vol. 26. — № 2. — P. 379–389.
120. Jin B.Y. et al. Engineered T cells targeting E7 mediate regression of human papillomavirus cancers in a murine model // *JCI insight.* — 2018. — Vol. 3. — № 8. — P. e99488.
121. Zacharakis N. et al. Immune recognition of somatic mutations leading to complete durable regression in metastatic breast cancer // *Nat. Med.* — 2018. — Vol. 24. — № 6. — P. 724–730.
122. Abrams S.I. et al. Generation of stable CD4⁺ and CD8⁺ T cell lines from patients immunized with ras oncogene-derived peptides reflecting codon 12 mutations // *Cell. Immunol.* — 1997. — Vol. 182. — № 2. — P. 137–151.
123. Cafri G. et al. Memory T cells targeting oncogenic mutations detected in peripheral blood of epithelial cancer patients // *Nat. Commun.* — 2019. — Vol. 10. — № 1. — P. 449.
124. Butler M.O., Hirano N. Human cell-based artificial antigen-presenting cells for cancer immunotherapy // *Immunol. Rev.* — 2014. — Vol. 257. — № 1. — P. 191–209.
125. Neal L.R. et al. The Basics of Artificial Antigen Presenting Cells in T Cell-Based Cancer Immunotherapies // *J. Immunol. Res. Ther.* — 2017. — Vol. 2. — № 1. — P. 68–79.
126. Cibrián D., Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper // *Eur. J. Immunol.* — 2017. — Vol. 47. — № 6. — P. 946–953.
127. Kim J.-O. et al. NF-kappaB and AP-1 regulate activation-dependent CD137 (4-1BB) expression in T cells // *FEBS Lett.* — 2003. — Vol. 541. — № 1–3. — P. 163–170.
128. Altman J.D. et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes // *Science* . — 1996. — Vol. 274. — № 5284. — P. 94–96.

129. Matsui K. et al. Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with T-cell responsiveness // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 1994. — Vol. 91. — № 26. — P. 12862–12866.
130. Barnes E. et al. Ultra-sensitive class I tetramer analysis reveals previously undetectable populations of antiviral CD8⁺ T cells // *Eur. J. Immunol.* — 2004. — Vol. 34. — № 6. — P. 1570–1577.
131. Scriba T.J. et al. Ultrasensitive detection and phenotyping of CD4⁺ T cells with optimized HLA class II tetramer staining // *J. Immunol.* — 2005. — Vol. 175. — № 10. — P. 6334–6343.
132. Lee P.P. et al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients // *Nat. Med.* — 1999. — Vol. 5. — № 6. — P. 677–685.
133. Keenan R.D. et al. Purification of cytomegalovirus-specific CD8 T cells from peripheral blood using HLA-peptide tetramers // *Br. J. Haematol.* — 2001. — Vol. 115. — № 2. — P. 428–434.
134. Greten T.F. et al. Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11-19- specific CD8(+) T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 1998. — Vol. 95. — № 13. — P. 7568–7573.
135. Appay V. et al. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function // *J. Exp. Med.* — 2000. — Vol. 192. — № 1. — P. 63–75.
136. Whelan J.A. et al. Specificity of CTL interactions with peptide-MHC class I tetrameric complexes is temperature dependent // *J. Immunol.* — 1999. — Vol. 163. — № 8. — P. 4342–4348.
137. Daniels M.A., Jameson S.C. Critical role for CD8 in T cell receptor binding and activation by peptide/major histocompatibility complex multimers // *J. Exp. Med.* — 2000. — Vol. 191. — № 2. — P. 335–346.
138. Wang B. et al. Naive CD8⁺ T cells do not require costimulation for proliferation and differentiation into cytotoxic effector cells // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 164. — № 3. — P. 1216–1222.
139. Purbhoo M.A. et al. The human CD8 coreceptor effects cytotoxic T cell activation and antigen sensitivity primarily by mediating complete phosphorylation of the T cell receptor zeta chain // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Vol. 276. — № 35. — P. 32786–32792.
140. Wooldridge L. et al. Tricks with tetramers: how to get the most from multimeric peptide-MHC // *Immunology.* — 2009. — Vol. 126. — № 2. — P. 147–164.
141. Schott E., Ploegh H.L. Mouse MHC class I tetramers that are unable to bind to CD8 reveal the

- need for CD8 engagement in order to activate naive CD8 T cells // *Eur. J. Immunol.* — 2002. — Vol. 32. — № 12. — P. 3425–3434.
142. Bodinier M. et al. Efficient detection and immunomagnetic sorting of specific T cells using multimers of MHC class I and peptide with reduced CD8 binding // *Nat. Med.* — 2000. — Vol. 6. — № 6. — P. 707–710.
143. Lu Y.-C. et al. Direct identification of neoantigen-specific TCRs from tumor specimens by high-throughput single-cell sequencing // *J. Immunother. cancer.* — 2021. — Vol. 9. — № 7. — P. e002595.
144. Roth T.L. et al. Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting // *Nature.* — 2018. — Vol. 559. — № 7714. — P. 405–409.
145. Puig-Saus C., Ribas A. Gene editing: Towards the third generation of adoptive T-cell transfer therapies // *Immuno-Oncology Technol.* — 2019. — Vol. 1. — P. 19–26.
146. Clauss J. et al. Efficient Non-Viral T-Cell Engineering by Sleeping Beauty Minicircles Diminishing DNA Toxicity and miRNAs Silencing the Endogenous T-Cell Receptors // *Hum. Gene Ther.* — 2018. — Vol. 29. — № 5. — P. 569–584.
147. Kebriaei P. et al. Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells // *J. Clin. Invest.* — 2016. — Vol. 126. — № 9. — P. 3363–3376.
148. Gomez-Eerland R. et al. Manufacture of Gene-Modified Human T-Cells with a Memory Stem/Central Memory Phenotype // *Hum. Gene Ther. Methods.* — 2014. — Vol. 25. — № 5. — P. 277–287.
149. Engels B. et al. Retroviral Vectors for High-Level Transgene Expression in T Lymphocytes // *Hum. Gene Ther.* — 2003. — Vol. 14. — № 12. — P. 1155–1168.
150. Lorenz F.K.M. et al. Unbiased Identification of T-Cell Receptors Targeting Immunodominant Peptide–MHC Complexes for T-Cell Receptor Immunotherapy // *Hum. Gene Ther.* — 2017. — Vol. 28. — № 12. — P. 1158–1168.
151. Marcucci K.T. et al. Retroviral and Lentiviral Safety Analysis of Gene-Modified T Cell Products and Infused HIV and Oncology Patients // *Mol. Ther.* — 2018. — Vol. 26. — № 1. — P. 269–279.
152. Davies R. et al. An optimized multiplex flow cytometry protocol for the analysis of intracellular signaling in peripheral blood mononuclear cells // *J. Immunol. Methods.* — 2016. — Vol. 436. — P. 58–63.
153. Maecker H.T. Multiparameter flow cytometry monitoring of T cell responses // *Methods Mol*

- Biol. — 2009. — Vol. 485.— P. 375–391.
154. Zaritskaya L. et al. New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity // *Expert Rev. Vaccines*. — 2010. — Vol. 9. — № 6. — P. 601–616.
155. Rubinstein M.P. et al. Interleukin-12 enhances the function and anti-tumor activity in murine and human CD8+ T cells // *Cancer Immunol. Immunother.* — 2015. — Vol. 64. — № 5. — P. 539–549.
156. Betts M.R. et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation // *J. Immunol. Methods*. — 2003. — Vol. 281. — № 1. — P. 65–78.
157. Krzewski K. et al. LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity // *Blood*. — 2013. — Vol. 121. — № 23. — P. 4672–4683.
158. Aktas E. et al. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity // *Cell. Immunol.* — 2009. — Vol. 254. — № 2. — P. 149–154.
159. Bossi G. et al. The secretory synapse: the secrets of a serial killer // *Immunol. Rev.* — 2002. — Vol. 189. — № 1. — P. 152–160.
160. Wajant H. CD95L/FasL and TRAIL in tumour surveillance and cancer therapy // *Cancer Treat. Res.* — 2006. — Vol. 130. — P. 141–165.
161. Brunner K.T. et al. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs // *Immunology*. — 1968. — Vol. 14. — № 2. — P. 181–196.
162. Fassy J. et al. A real-time digital bio-imaging system to quantify cellular cytotoxicity as an alternative to the standard chromium-51 release assay // *Immunology*. — 2017. — Vol. 150. — № 4. — P. 489–494.
163. Matta H. et al. Development and characterization of a novel luciferase based cytotoxicity assay // *Sci. Rep.* — 2018. — Vol. 8. — № 1. — P. 199.
164. Karimi M.A. et al. Measuring Cytotoxicity by Bioluminescence Imaging Outperforms the Standard Chromium-51 Release Assay // *PLoS One*. — 2014. — Vol. 9. — № 2. — P. e89357.
165. Korzeniewski C., Callewaert D.M. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity // *J. Immunol. Methods*. — 1983. — Vol. 64. — № 3. — P. 313–320.
166. Cox M.C. et al. Application of LDH assay for therapeutic efficacy evaluation of ex vivo tumor models // *Sci. Rep.* — 2021. — Vol. 11. — № 1. — P. 18571.
167. Decker T., Lohmann-Matthes M.L. A quick and simple method for the quantitation of lactate

- dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity // *J. Immunol. Methods.* — 1988. — Vol. 115. — № 1. — P. 61–69.
168. Stegle O., Teichmann S.A., Marioni J.C. Computational and analytical challenges in single-cell transcriptomics // *Nat. Rev. Genet.* — 2015. — Vol. 16. — № 3. — P. 133–145.
169. Lee H. et al. A unique expression pattern of LAG3 distinct from that of other immune checkpoints in diffuse large B-cell lymphoma // *Cancer Med.* — 2023. — Vol. 12. — № 15. — P. 16359–16369.
170. MacCann R. et al. Dysregulated early transcriptional signatures linked to mast cell and interferon responses are implicated in COVID-19 severity // *Front. Immunol.* — 2023. — Vol. 14. — P. 1166574.
171. Carone C. et al. Immune Gene Expression Profile in Hepatocellular Carcinoma and Surrounding Tissue Predicts Time to Tumor Recurrence // *Liver cancer.* — 2018. — Vol. 7. — № 3. — P. 277–294.
172. Zhang Y., Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications // *Cell. Mol. Immunol.* — 2020. — Vol. 17. — № 8. — P. 807–821.
173. Herlyn D., Birebent B. Advances in cancer vaccine development. // *Ann. Med.*— 1999. — Vol. 31. — № 1. — P. 66–78.
174. Ilyas S., Yang J.C. Landscape of Tumor Antigens in T Cell Immunotherapy // *J. Immunol.* — 2015. — Vol. 195. — № 11. — P. 5117–5122.
175. Almeida L.G. et al. CTdatabase: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens // *Nucleic Acids Res.* — 2009. — Vol. 37. — № Database issue. — P. D816–D819.
176. Gjerstorff M.F., Andersen M.H., Ditzel H.J. Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy // *Oncotarget.* — 2015. — Vol. 6. — № 18. — P. 15772–15787.
177. Chen Q. et al. Immunodominant CD4+ responses identified in a patient vaccinated with full-length NY-ESO-1 formulated with ISCOMATRIX adjuvant // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2004. — Vol. 101. — № 25. — P. 9363–9368.
178. Chen Y.T. et al. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 1997. — Vol. 94. — № 5. — P. 1914–1918.
179. Jäger E. et al. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen

- NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes // *J. Exp. Med.* — 1998. — Vol. 187. — № 2. — P. 265–270.
180. Pagotto A. et al. Centrosomal localisation of the cancer/testis (CT) antigens NY-ESO-1 and MAGE-C1 is regulated by proteasome activity in tumour cells // *PLoS One.* — 2013. — Vol. 8. — № 12. — P. e83212.
 181. Satie A.-P. et al. The cancer-testis gene, NY-ESO-1, is expressed in normal fetal and adult testes and in spermatocytic seminomas and testicular carcinoma in situ // *Lab. Invest.* — 2002. — Vol. 82. — № 6. — P. 775–780.
 182. Nicholaou T. et al. Directions in the immune targeting of cancer: Lessons learned from the cancer-testis Ag NY-ESO-1 // *Immunol. & Cell Biol.* — 2006. — Vol. 84. — № 3. — P. 303–317.
 183. Jungbluth A.A. et al. Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues // *Int. J. cancer.* — 2001. — Vol. 92. — № 6. — P. 856–860.
 184. Gnjatic S. et al. NY-ESO-1: Review of an Immunogenic Tumor Antigen // *Advances in cancer research.* — 2006. — Vol. 95. — P. 1–30.
 185. Cartron P.-F. et al. HDAC1-mSin3a-NCOR1, Dnmt3b-HDAC1-Egr1 and Dnmt1-PCNA-UHRF1-G9a regulate the NY-ESO1 gene expression // *Mol. Oncol.* — 2013. — Vol. 7. — № 3. — P. 452–463.
 186. Li B. et al. Induction of a specific CD8⁺ T-cell response to cancer/testis antigens by demethylating pre-treatment against osteosarcoma // *Oncotarget.* — 2014. — Vol. 5. — № 21. — P. 10791–10802.
 187. Gunda V. et al. A Potential Role for Immunotherapy in Thyroid Cancer by Enhancing NY-ESO-1 Cancer Antigen Expression // *Thyroid.* — 2014. — Vol. 24. — № 8. — P. 1241–1250.
 188. Natsume A. et al. The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates NY-ESO-1 antigenicity in orthotopic human glioma // *Int. J. cancer.* — 2008. — Vol. 122. — № 11. — P. 2542–2553.
 189. Hemminger J.A. et al. The cancer-testis antigen NY-ESO-1 is highly expressed in myxoid and round cell subset of liposarcomas // *Mod. Pathol.* — 2013. — Vol. 26. — № 2. — P. 282–288.
 190. Endo M. et al. NY-ESO-1 (CTAG1B) expression in mesenchymal tumors. // *Mod. Pathol.* — 2015. — Vol. 28. — № 4. — P. 587–595.
 191. Söling A., Schurr P., Berthold F. Expression and clinical relevance of NY-ESO-1, MAGE-1 and MAGE-3 in neuroblastoma // *Anticancer Res.* — 1999. — Vol. 19. — № 3B. — P. 2205–2209.
 192. Barrow C. et al. Tumor Antigen Expression in Melanoma Varies According to Antigen and Stage

- // Clin. Cancer Res. — 2006. — Vol. 12. — № 3. — P. 764–771.
193. Rodolfo M. et al. Antigen-Specific Immunity in Neuroblastoma Patients: Antibody and T-Cell Recognition of NY-ESO-1 Tumor Antigen // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — № 20. — P. 6948–6955.
194. Odunsi K. et al. NY-ESO-1 and LAGE-1 Cancer-Testis Antigens Are Potential Targets for Immunotherapy in Epithelial Ovarian Cancer // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — № 18. — P. 6076–6083.
195. Jungbluth A.A. et al. Monophasic and biphasic synovial sarcomas abundantly express cancer/testis antigen ny-eso-1 but not mage-a1 or ct7 // *Int. J. Cancer.* — 2001. — Vol. 94. — № 2. — P. 252–256.
196. Pollack S.M. et al. NY-ESO-1 is a ubiquitous immunotherapeutic target antigen for patients with myxoid/round cell liposarcoma // *Cancer.* — 2012. — Vol. 118. — № 18. — P. 4564–4570.
197. Hei S.M. et al. [Pathological significance of NY-ESO-1 expression in the diagnosis of myxoid liposarcoma]. // *Zhonghua bing li xue za zhi = Chinese J. Pathol.* — 2019. — Vol. 48. — № 3. — P. 225–230.
198. Jo U. et al. NY-ESO-1 as a diagnostic and prognostic marker for myxoid liposarcoma // *Am. J. Transl. Res.* — 2022. — Vol. 14. — № 2. — P. 1268–1278.
199. Lai J.-P. et al. NY-ESO-1 expression in synovial sarcoma and other mesenchymal tumors: significance for NY-ESO-1-based targeted therapy and differential diagnosis // *Mod. Pathol.* — 2012. — Vol. 25. — № 6. — P. 854–858.
200. Lai J.-P. et al. NY-ESO-1 expression in sarcomas: A diagnostic marker and immunotherapy target // *Oncoimmunology.* — 2012. — Vol. 1. — № 8. — P. 1409–1410.
201. Szender J.B. et al. NY-ESO-1 expression predicts an aggressive phenotype of ovarian cancer // *Gynecol. Oncol.* — 2017. — Vol. 145. — № 3. — P. 420–425.
202. Linette G.P. et al. Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma // *Blood.* — 2013. — Vol. 122. — № 6. — P. 863–871.
203. Morgan R.A. et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy // *J. Immunother.* — 2013. — Vol. 36. — № 2. — P. 133–151.
204. Fujiwara S. et al. NY-ESO-1 antibody as a novel tumour marker of gastric cancer // *Br. J. Cancer.* — 2013. — Vol. 108. — № 5. — P. 1119–1125.
205. Luetkens T. et al. Functional autoantibodies against SSX-2 and NY-ESO-1 in multiple myeloma patients after allogeneic stem cell transplantation // *Cancer Immunol. Immunother.* — 2014. —

- Vol. 63. — № 11. — P. 1151–1162.
206. Oshima Y. et al. NY-ESO-1 autoantibody as a tumor-specific biomarker for esophageal cancer: screening in 1969 patients with various cancers // *J. Gastroenterol.* — 2016. — Vol. 51. — № 1. — P. 30–34.
207. Jäger E. et al. Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)-DRB4*0101-0103 and recognized by CD4(+) T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma // *J. Exp. Med.* — 2000. — Vol. 191. — № 4. — P. 625–630.
208. Zeng G. et al. CD4(+) T cell recognition of MHC class II-restricted epitopes from NY-ESO-1 presented by a prevalent HLA DP4 allele: association with NY-ESO-1 antibody production // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2001. — Vol. 98. — № 7. — P. 3964–3969.
209. Zarour H.M. et al. NY-ESO-1 encodes DRB1*0401-restricted epitopes recognized by melanoma-reactive CD4+ T cells // *Cancer Res.* — 2000. — Vol. 60. — № 17. — P. 4946–4952.
210. Zarour H.M. et al. NY-ESO-1 119-143 is a promiscuous major histocompatibility complex class II T-helper epitope recognized by Th1- and Th2-type tumor-reactive CD4+ T cells // *Cancer Res.* — 2002. — Vol. 62. — № 1. — P. 213–218.
211. Zeng G. et al. Identification of CD4+ T cell epitopes from NY-ESO-1 presented by HLA-DR molecules // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 165. — № 2. — P. 1153–1159.
212. Gnjatich S. et al. Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2003. — Vol. 100. — № 15. — P. 8862–8867.
213. Zeng G. et al. Dendritic cell surface calreticulin is a receptor for NY-ESO-1: direct interactions between tumor-associated antigen and the innate immune system // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 177. — № 6. — P. 3582–3589.
214. Liu Y. et al. Polymeric structure and host Toll-like receptor 4 dictate immunogenicity of NY-ESO-1 antigen in vivo // *J. Biol. Chem.* — 2011. — Vol. 286. — № 43. — P. 37077–37084.
215. Liu Y., Zeng G. Cancer and innate immune system interactions: translational potentials for cancer immunotherapy // *J. Immunother.* — 2012. — Vol. 35. — № 4. — P. 299–308.
216. Xu L. et al. Enhancing whole-tumor cell vaccination by engaging innate immune system through NY-ESO-1/dendritic cell interactions // *J. Immunother.* — 2013. — Vol. 36. — № 8. — P. 412–422.
217. Sahin U. et al. An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma // *Nature.* — 2020. — Vol. 585. — № 7823. — P. 107–112.

218. Jäger E. et al. Recombinant vaccinia/fowlpox NY-ESO-1 vaccines induce both humoral and cellular NY-ESO-1-specific immune responses in cancer patients // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2006. — Vol. 103. — № 39. — P. 14453–14458.
219. Odunsi K. et al. Efficacy of vaccination with recombinant vaccinia and fowlpox vectors expressing NY-ESO-1 antigen in ovarian cancer and melanoma patients // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2012. — Vol. 109. — № 15. — P. 5797–5802.
220. Pollack S.M. et al. First-in-Human Treatment With a Dendritic Cell-targeting Lentiviral Vector-expressing NY-ESO-1, LV305, Induces Deep, Durable Response in Refractory Metastatic Synovial Sarcoma Patient // *J. Immunother.* — 2017. — Vol. 40. — № 8. — P. 302–306.
221. Somaiah N. et al. A Phase 1b Study Evaluating the Safety, Tolerability, and Immunogenicity of CMB305, a Lentiviral-Based Prime-Boost Vaccine Regimen, in Patients with Locally Advanced, Relapsed, or Metastatic Cancer Expressing NY-ESO-1 // *Oncoimmunology.* — 2020. — Vol. 9. — № 1. — P. 1847846.
222. Chawla S.P. et al. Phase II Randomized Study of CMB305 and Atezolizumab Compared With Atezolizumab Alone in Soft-Tissue Sarcomas Expressing NY-ESO-1 // *J. Clin. Oncol.* — 2022. — Vol. 40. — № 12. — P. 1291–1300.
223. Dutoit V. et al. Multiepitope CD8(+) T cell response to a NY-ESO-1 peptide vaccine results in imprecise tumor targeting // *J. Clin. Invest.* — 2002. — Vol. 110. — № 12. — P. 1813–1822.
224. Bioley G. et al. Vaccination with a recombinant protein encoding the tumor-specific antigen NY-ESO-1 elicits an A2/157-165-specific CTL repertoire structurally distinct and of reduced tumor reactivity than that elicited by spontaneous immune responses to NY-ESO-1-expressing Tumors// *J. Immunother.* — 2009. — Vol. 32. — № 2. — P. 161–168.
225. Le Gal F.-A. et al. Distinct structural TCR repertoires in naturally occurring versus vaccine-induced CD8+ T-cell responses to the tumor-specific antigen NY-ESO-1 // *J. Immunother.* — 2005. — Vol. 28. — № 3. — P. 252–257.
226. Hunder N.N. et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1 // *N. Engl. J. Med.* — 2008. — Vol. 358. — № 25. — P. 2698–2703.
227. D'Angelo S.P. et al. Antitumor Activity Associated with Prolonged Persistence of Adoptively Transferred NY-ESO-1 (c259)T Cells in Synovial Sarcoma // *Cancer Discov.* — 2018. — Vol. 8. — № 8. — P. 944–957.
228. Joseph J. et al. Guillain-Barre syndrome observed with adoptive transfer of lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1 reactive T-cell receptor // *J. Immunother. cancer.* — 2019. — Vol. 7. — № 1. — P. 296.

229. Rapoport A.P. et al. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma // *Nat. Med.* — 2015. — Vol. 21. — № 8. — P. 914–921.
230. Stadtmauer E.A. et al. Long-term safety and activity of NY-ESO-1 SPEAR T cells after autologous stem cell transplant for myeloma // *Blood Adv.* — 2019. — Vol. 3. — № 13. — P. 2022–2034.
231. Kawai A. et al. Safety and Efficacy of NY-ESO-1 Antigen-Specific T-Cell Receptor Gene-Transduced T Lymphocytes in Patients with Synovial Sarcoma: A Phase I/II Clinical Trial // *Clin. cancer Res.* — 2023. — Vol. 29. — № 24. — P. 5069–5078.
232. Kawai A. et al. Results from phase I/II study of NY-ESO-1-specific TCR gene-transduced T cell therapy (TBI-1301, mipetresgene autoleucel) in patients with advanced synovial sarcoma // *J. Clin. Oncol.* — 2023. — Vol. 41. — № 16. — P. 11558.
233. Frankiw L. et al. Immunotherapy resistance driven by loss of NY-ESO-1 expression in response to transgenic adoptive cellular therapy with PD-1 blockade // *J. Immunother. cancer.* — 2023. — Vol. 11. — № 5. — P. e006930.
234. Moynihan K.D. et al. Eradication of large established tumors in mice by combination immunotherapy that engages innate and adaptive immune responses // *Nat. Med.* — 2016. — Vol. 22. — № 12. — P. 1402–1410.
235. Liu H. et al. Structure-based programming of lymph-node targeting in molecular vaccines // *Nature.* — 2014. — Vol. 507. — № 7493. — P. 519–522.
236. Trevaskis N.L., Kaminskas L.M., Porter C.J.H. From sewer to saviour - targeting the lymphatic system to promote drug exposure and activity // *Nat. Rev. Drug Discov.* — 2015. — Vol. 14. — № 11. — P. 781–803.
237. Steinbuck M.P. et al. A lymph node-targeted Amphiphile vaccine induces potent cellular and humoral immunity to SARS-CoV-2 // *Sci. Adv.* — 2021. — Vol. 7. — № 6. — P. eabe5819.
238. Drakes D.J. et al. Lymph Node-Targeted Vaccine Boosting of TCR T-cell Therapy Enhances Antitumor Function and Eradicates Solid Tumors // *Cancer Immunol. Res.* — 2024. — Vol. 12. — № 2. — P. 214–231.
239. Ishihara M. et al. NY-ESO-1-specific redirected T cells with endogenous TCR knockdown mediate tumor response and cytokine release syndrome // *J. Immunother. cancer.* — 2022. — Vol. 10. — № 6. — P. e003811.
240. Ishihara M. et al. A phase 1 trial of NY-ESO-1-specific TCR-engineered T-cell therapy combined with a lymph node-targeting nanoparticulate peptide vaccine for the treatment of advanced soft

- tissue sarcoma // *Int. J. cancer.* — 2023. — Vol. 152. — № 12. — P. 2554–2566.
241. Zhang Q. et al. Adoptive transfer of tumor-reactive transforming growth factor-beta-insensitive CD8⁺ T cells: eradication of autologous mouse prostate cancer // *Cancer Res.* — 2005. — Vol. 65. — № 5. — P. 1761–1769.
242. Caligiuri M.A. et al. Immunotherapeutic Approaches for Hematologic Malignancies // *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* — 2004. — P. 337–353.
243. Liu E. et al. Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity // *Leukemia.* — 2018. — Vol. 32. — № 2. — P. 520–531.
244. Saetersmoen M.L. et al. Off-the-shelf cell therapy with induced pluripotent stem cell-derived natural killer cells // *Semin. Immunopathol.* — 2019. — Vol. 41. — № 1. — P. 59–68.
245. Alsalloum A. et al. TCR-Engineered Lymphocytes Targeting NY-ESO-1: In Vitro Assessment of Cytotoxicity against Tumors // *Biomedicines.* — 2023. — Vol. 11. — № 10. — P. 2805.
246. Kuznetsova M.S. et al. Phenotypic and functional features of in vitro generated TCR-T cells specific for the tumor-associated antigen NY-ESO-1 // *Immunologiya.* — 2022. — Vol. 43. — № 5. — P. 536–547.
247. Hao Y. et al. Dictionary learning for integrative, multimodal and scalable single-cell analysis // *Nat. Biotechnol.* — 2024. — Vol. 42. — № 2. — P. 293–304.
248. Korsunsky I. et al. Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony // *Nat. Methods.* — 2019. — Vol. 16. — № 12. — P. 1289–1296.
249. Melsen J.E. et al. A Comprehensive Workflow for Applying Single-Cell Clustering and Pseudotime Analysis to Flow Cytometry Data // *J. Immunol.* — 2020. — Vol. 205. — № 3. — P. 864–871.
250. Fang Z., Liu X., Peltz G. GSEAPy: a comprehensive package for performing gene set enrichment analysis in Python // *Bioinformatics.* — 2023. — Vol. 39. — № 1. — P. btac757.
251. Hafemeister C., Satija R. Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression // *Genome Biol.* — 2019. — Vol. 20. — № 1. — P. 296.
252. Navalgund L.G. et al. Cell cycle regulation of thymidylate synthetase gene expression in cultured mouse fibroblasts // *J. Biol. Chem.* — 1980. — Vol. 255. — № 15. — P. 7386–7390.
253. Alsalloum A. et al. Decoding NY-ESO-1 TCR T cells: transcriptomic insights reveal dual mechanisms of tumor targeting in a melanoma murine xenograft model // *Front. Immunol.* —

2024. — Vol. 15. — P. 1507218.
254. Zhang Y. et al. TCR engineered T cells for solid tumor immunotherapy // *Exp. Hematol. Oncol.* — 2022. — Vol. 11. — № 1. — P. 38.
255. Baulu E. et al. TCR-engineered T cell therapy in solid tumors: State of the art and perspectives // *Sci. Adv.* — 2023. — Vol. 9. — № 7. — P. eadf3700.
256. Raza A. et al. Unleashing the immune response to NY-ESO-1 cancer testis antigen as a potential target for cancer immunotherapy // *J. Transl. Med.* — 2020. — Vol. 18. — № 1. — P. 140.
257. Quintás-Cardama A. et al. Multifactorial optimization of gammaretroviral gene transfer into human T lymphocytes for clinical application // *Hum. Gene Ther.* — 2007. — Vol. 18. — № 12. — P. 1253–1260.
258. Dodo K. et al. An efficient large-scale retroviral transduction method involving preloading the vector into a RetroNectin-coated bag with low-temperature shaking // *PLoS One.* — 2014. — Vol. 9. — № 1. — P. e86275.
259. Saxena A., Dagur P.K., Biancotto A. Multiparametric Flow Cytometry Analysis of Naïve, Memory, and Effector T Cells // *Methods Mol Biol.* — 2019. — Vol. 2032 — P. 129–140.
260. Golubovskaya V., Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy // *Cancers.* — 2016. — Vol. 8. — № 3. — P. 36.
261. Wherry E.J. T cell exhaustion // *Nat. Immunol.* — 2011. — Vol. 12. — № 6. — P. 492–499.
262. Yi J.S., Cox M.A., Zajac A.J. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion // *Immunology.* — 2010. — Vol. 129. — № 4. — P. 474–481.
263. Legat A. et al. Inhibitory Receptor Expression Depends More Dominantly on Differentiation and Activation than “Exhaustion” of Human CD8 T Cells // *Front. Immunol.* — 2013. — Vol. 4. — P. 455.
264. Borst J. et al. CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy // *Nat. Rev. Immunol.* — 2018. — Vol. 18. — № 10. — P. 635–647.
265. Castellino F., Germain R.N. Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how // *Annu. Rev. Immunol.* — 2006. — Vol. 24. — P. 519–540.
266. Bevan M.J. Helping the CD8+ T-cell response // *Nat. Rev. Immunol.* — 2004. — Vol. 4. — № 8. — P. 595–602.
267. Livingstone A.M. et al. Unravelling the mechanisms of help for CD8+ T cell responses // *Immunol. Res.* — 2009. — Vol. 45. — № 2–3. — P. 209–217.

268. Moeller M. et al. Adoptive transfer of gene-engineered CD4⁺ helper T cells induces potent primary and secondary tumor rejection // *Blood*. — 2005. — Vol. 106. — № 9. — P. 2995–3003.
269. Iqbal M.M. et al. Mapping the landscape of chromatin dynamics during naïve CD4⁺ T-cell activation // *Sci. Rep.* — 2021. — Vol. 11. — № 1. — P. 14101.
270. Castellino F. et al. Chemokines enhance immunity by guiding naïve CD8⁺ T cells to sites of CD4⁺ T cell–dendritic cell interaction // *Nature*. — 2006. — Vol. 440. — № 7086. — P. 890–895.
271. González-Martín A., Mira E., Mañes S. CCR5 in cancer immunotherapy: More than an “attractive” receptor for T cells // *Oncoimmunology*. — 2012. — Vol. 1. — № 1. — P. 106–108.
272. Moon E.K. et al. Expression of a Functional CCR2 Receptor Enhances Tumor Localization and Tumor Eradication by Retargeted Human T cells Expressing a Mesothelin-Specific Chimeric Antibody Receptor // *Clin. Cancer Res.* — 2011. — Vol. 17. — № 14. — P. 4719–4730.
273. Chiang E.Y. et al. CD96 functions as a co-stimulatory receptor to enhance CD8(+) T cell activation and effector responses // *Eur. J. Immunol.* — 2020. — Vol. 50. — № 6. — P. 891–902.
274. Christensen J.E. et al. CD11b expression as a marker to distinguish between recently activated effector CD8⁺ T cells and memory cells // *Int. Immunol.* — 2001. — Vol. 13. — № 4. — P. 593–600.
275. Sun X. et al. CD30 Ligand/CD30 Plays a Critical Role in Th17 Differentiation in Mice // *J. Immunol.* — 2010. — Vol. 185. — № 4. — P. 2222–2230.
276. Bhat M.Y. et al. Comprehensive network map of interferon gamma signaling // *J. Cell Commun. Signal.* — 2018. — Vol. 12. — № 4. — P. 745–751.
277. Legut M. et al. A genome-scale screen for synthetic drivers of T cell proliferation // *Nature*. — 2022. — Vol. 603. — № 7902. — P. 728–735.
278. Jiang J. et al. Crystal structure of human p32, a doughnut-shaped acidic mitochondrial matrix protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 1999. — Vol. 96. — № 7. — P. 3572–3577.
279. Zhai X. et al. Mitochondrial C1qbp promotes differentiation of effector CD8(+) T cells via metabolic-epigenetic reprogramming // *Sci. Adv.* — 2021. — Vol. 7. — № 49. — P. eabk0490.
280. Holgado M.P. et al. CD32 Ligation Promotes the Activation of CD4(+) T Cells // *Front. Immunol.* — 2018. — Vol. 9. — P. 2814.
281. Krishnan S. et al. The FcR gamma subunit and Syk kinase replace the CD3 zeta-chain and ZAP-70 kinase in the TCR signaling complex of human effector CD4 T cells // *J. Immunol.* — 2003.

- Vol. 170. — № 8. — P. 4189–4195.
282. Lu B. et al. Kinetic analysis of genomewide gene expression reveals molecule circuitries that control T cell activation and Th1/2 differentiation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2004. — Vol. 101. — № 9. — P. 3023–3028.
283. Bermejo M. et al. Activation of blood T lymphocytes down-regulates CXCR4 expression and interferes with propagation of X4 HIV strains // *Eur. J. Immunol.* — 1998. — Vol. 28. — № 10. — P. 3192–3204.
284. Rheinländer A., Schraven B., Bommhardt U. CD45 in human physiology and clinical medicine // *Immunol. Lett.* — 2018. — Vol. 196. — P. 22–32.
285. Larbi A., Fulop T. From “truly naïve” to “exhausted senescent” T cells: when markers predict functionality // *Cytometry A.* — 2014. — Vol. 85. — № 1. — P. 25–35.
286. Saxena A., Dagur P.K., Biancotto A. Multiparametric Flow Cytometry Analysis of Naïve, Memory, and Effector T Cells // *Methods Mol. Biol.* — 2019. — Vol. 2032. — P. 129–140.
287. Yang S. et al. The shedding of CD62L (L-selectin) regulates the acquisition of lytic activity in human tumor reactive T lymphocytes // *PLoS One.* — 2011. — Vol. 6. — № 7. — P. e22560.
288. Chen W. et al. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3 // *J. Exp. Med.* — 2003. — Vol. 198. — № 12. — P. 1875–1886.
289. Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 // *Science.* — 2003. — Vol. 299. — № 5609. — P. 1057–1061.
290. Penna D. et al. Degradation of ZAP-70 following antigenic stimulation in human T lymphocytes: role of calpain proteolytic pathway // *J. Immunol.* — 1999. — Vol. 163. — № 1. — P. 50–56.
291. Yang Y. et al. TCR engagement negatively affects CD8 but not CD4 CAR T cell expansion and leukemic clearance // *Sci. Transl. Med.* — 2017. — Vol. 9. — № 417. — P. eaag1209.
292. Olivo Pimentel V. et al. A novel co-culture assay to assess anti-tumor CD8⁺ T cell cytotoxicity via luminescence and multicolor flow cytometry // *J. Immunol. Methods.* — 2020. — Vol. 487. — P. 112899.
293. Lorenzo-Herrero S. et al. CD107a Degranulation Assay to Evaluate Immune Cell Antitumor Activity // *Methods Mol. Biol.* — 2019. — Vol. 1884. — P. 119–130.
294. Nagata S. Apoptosis by Death Factor // *Cell.* — 1997. — Vol. 88. — № 3. — P. 355–365.
295. Kum W.W. et al. Temporal sequence and kinetics of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine secretion induced by toxic shock syndrome toxin 1 in human peripheral blood

- mononuclear cells // *Infect. Immun.* — 2001. — Vol. 69. — № 12. — P. 7544–7549.
296. Morvan P.Y. et al. Distinct pattern of IL-2 and IFN-gamma gene expression in CD4 and CD8 T cells: cytofluorometric analysis at a single cell level using non-radioactive probes // *Cell. Mol. Biol.* — 1995. — Vol. 41. — № 7. — P. 945–957.
297. Abdalla A.O. et al. Kinetics of cytokine gene expression in human CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocyte subsets using quantitative real-time PCR // *Scand. J. Immunol.* — 2003. — Vol. 58. — № 6. — P. 601–606.
298. Golstein P., Griffiths G.M. An early history of T cell-mediated cytotoxicity // *Nat. Rev. Immunol.* — 2018. — Vol. 18. — № 8. — P. 527–535.
299. Perussia B. Fc receptors on natural killer cells // *Curr Top Microbiol Immunol.* — 1998. — Vol. 230. — P. 63–88.
300. Li X.-Y. et al. NKG7 Is Required for Optimal Antitumor T-cell Immunity // *Cancer Immunol. Res.* — 2022. — Vol. 10. — № 2. — P. 154–161.
301. Noppen C. et al. C-type lectin-like receptors in peptide-specific HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes: differential expression and modulation of effector functions in clones sharing identical TCR structure and epitope specificity // *Eur. J. Immunol.* — 1998. — Vol. 28. — № 4. — P. 1134–1142.
302. Groh V. et al. Costimulation of CD8 α T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells // *Nat. Immunol.* — 2001. — Vol. 2. — № 3. — P. 255–260.
303. Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival // *Nat. Rev. Immunol.* — 2005. — Vol. 5. — № 3. — P. 201–214.
304. Guillerey C., Huntington N.D., Smyth M.J. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy // *Nat. Immunol.* — 2016. — Vol. 17. — № 9. — P. 1025–1036.
305. André P. et al. Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells // *Cell.* — 2018. — Vol. 175. — № 7. — P. 1731–1743.e13.
306. Gründemann C. et al. Cutting edge: identification of E-cadherin as a ligand for the murine killer cell lectin-like receptor G1 // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 176. — № 3. — P. 1311–1315.
307. Ito M. et al. Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity // *J. Exp. Med.* — 2006. — Vol. 203. — № 2. — P. 289–295.
308. Lankry D. et al. The interaction between CD300a and phosphatidylserine inhibits tumor cell killing by NK cells // *Eur. J. Immunol.* — 2013. — Vol. 43. — № 8. — P. 2151–2161.

309. Wong P. et al. T-BET and EOMES sustain mature human NK cell identity and antitumor function // *J. Clin. Invest.* — 2023. — Vol. 133. — № 13. — P. e162530.
310. Pritchard G.H. et al. Early T-bet promotes LFA1 upregulation required for CD8⁺ effector and memory T cell development // *J. Exp. Med.* — 2023. — Vol. 220. — № 2. — P. e20191287.
311. Hidalgo L.G. et al. The transcriptome of human cytotoxic T cells: similarities and disparities among allostimulated CD4(+) CTL, CD8(+) CTL and NK cells // *Am. J. Transplant.* — 2008. — Vol. 8. — № 3. — P. 627–636.
312. Zhao Y. et al. High-Affinity TCRs Generated by Phage Display Provide CD4⁺ T Cells with the Ability to Recognize and Kill Tumor Cell Lines // *J. Immunol.* — 2007. — Vol. 179. — № 9. — P. 5845–5854.
313. Sillito F., Holler A., Stauss H.J. Engineering CD4⁺ T Cells to Enhance Cancer Immunity // *Cells.* — 2020. — Vol. 9. — № 7. — P. 1721.
314. Zhou Q. et al. Humanized NOD-SCID IL2rg^{-/-} mice as a preclinical model for cancer research and its potential use for individualized cancer therapies // *Cancer Lett.* — 2014. — Vol. 344. — № 1. — P. 13–19.