



Алсаллум Алаа

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

3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук,
Профессор

Сенников Сергей Витальевич

Официальные оппоненты:

Коваль Ольга Александровна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Булатов Эмиль Рафаэлевич, PhD (биологические науки), ведущий научный сотрудник НИЛ "Биомедицинские технологии" Института фундаментальной медицины и биологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской Академии наук, г. Томск.

Защита состоится «22» января 2026 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета 24.1.184.01 (Д 001.001.XX) в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, д.14, к.211.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте <https://niikim.ru/ru/наука/объявления-диссовета>

Автореферат разослан « » _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

Кандидат биологических наук

Облеухова Ирина Александровна



Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Злокачественные новообразования остаются одной из наиболее значимых глобальных проблем здравоохранения, характеризующихся ежегодным ростом показателей заболеваемости и смертности [Sung et al., 2021]. Несмотря на широкое применение традиционных методов лечения, таких как хирургическое вмешательство, лучевая и химиотерапия, их эффективность зачастую ограничена развитием резистентности и высокой токсичностью [Knight et al., 2021; Albano et al., 2021]. 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 [Orzetti et al., 2022].

Иммунотерапия, занимающая особое место в лечении онкологических заболеваний, представляет собой инновационное направление, основанное на модуляции эффективности распознавания опухолевых клеток с целью повышения противоопухолевой активности клеток иммунной системы [Papaioannou et al., 2016]. Перспективным направлением в области иммунотерапии опухолей является применение адаптивной клеточной терапии (АКТ), подразумевающей экспансию *ex vivo* опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов (ТIL) 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 [Raijens et al., 2021].

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 [Guedan et al., 2019]. 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 [Edes et al., 2022]. CAR-Т-клеточная терапия основана на использовании одноцепочечных переменных фрагментов антител (scFv), экспрессируемых на инженерном рецепторе, для распознавания поверхностных антигенов клеток-мишеней [Hong et al., 2020]. Несмотря на продемонстрированный значительный успех CAR-Т-клеточной терапии при лечении гематологических злокачественных новообразований, ее применение в терапии солидных опухолей остается ограниченным в связи с ограниченной доступностью большинства внутриклеточных опухолевых антигенов [Flugel et al., 2023]. В данном контексте, генетически модифицированная TCR-Т-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 [Hiltensperger et al., 2023].

В настоящее время семейство антигенов, известных как раково-тестикулярные антигены (cancer-testis antigens, CTAs), представляет основной интерес в качестве мишеней для TCR-опосредованной адаптивной клеточной терапии. Их ключевая характеристика — строго ограниченная экспрессия в норме, наблюдаемая лишь в иммунопривилегированных тканях (таких как яички и плацента), и aberrантная реэкспрессия в различных типах опухолей [Zhao et al., 2024]. Особое место среди CTAs занимает белок NY-ESO-1 (New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma-1), впервые идентифицированный в ткани плоскоклеточной карциномы пищевода. Этот опухолеассоциированный антиген отличается высокой иммуногенностью, что проявляется в его способности индуцировать мощный как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ [Stockert et al., 1998; Thomas et al., 2018].

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 [Alsalloum, et al., 2024]. Клинические испытания адаптивной клеточной терапии с использованием генетически модифицированных TCR-Т-клеток при меланоме и синовиальной саркоме продемонстрировали обнадеживающие результаты с частотой объективного ответа до 40–60 % [Robbins et al., 2011, 2015]. 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 [Villani et al., 2017; Gohil et al., 2021; Huang et al., 2023]. 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 TCR-Т-клеток. Ожидается, что полученные результаты внесут существенный вклад в разработку перспективных терапевтических подходов на основе TCR-Т-клеток, направленных на преодоление терапевтической резистентности солидных новообразований.

Степень разработанности темы

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 TCR-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 TCR-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, перфорины, 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 NK-клеток (*KLRK1*, *FCGR3A*, *NKG7*), что указывает на наличие комбинированного механизма противоопухолевого действия — TCR-зависимого (антиген-специфичного) и TCR-независимого (аналогичного NK-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 NK-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 HCT-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-1_{157–165}/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, перфорина, 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-1_{157–165}/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: Отчетных конференциях аспирантов и ординаторов НИИФКИ (г. Новосибирск, 2022, 2023, 2024), II Международной конференции «Генетические технологии в трансляционной биомедицине» (г. Томск, 2023), XI Международная конференция молодых ученых OPENBIO (г. Новосибирск, 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.

Материалы и методы исследования

Объект исследования. являлись генетически модифицированные Т-лимфоциты человека, экспрессирующие $\alpha\beta$ -TCR, специфичный к эпитопу опухоль-ассоциированного антигена NY-ESO-1_{157–165} 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 1.

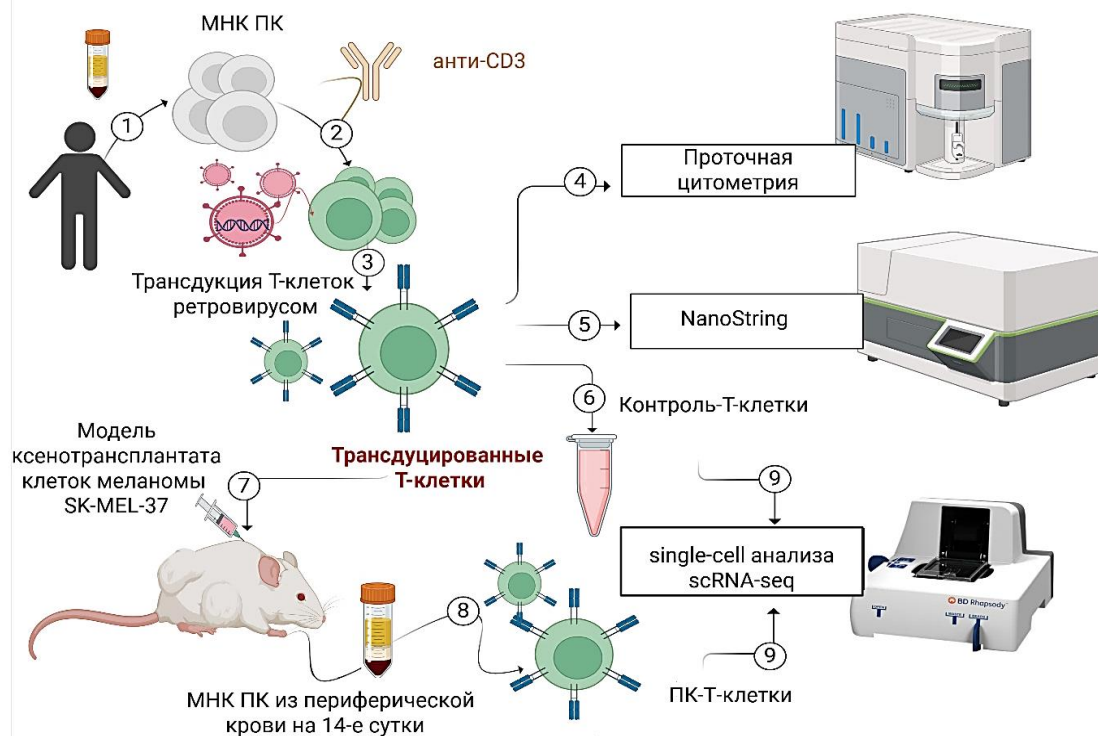


Рисунок 1 — Схема экспериментального исследования NY-ESO-1-специфичных TCR-модифицированных Т-клеток. На рисунке представлены следующие этапы работы: (1) выделение мононуклеарных клеток периферической крови (МНК ПК) от здоровых доноров; (2) стимуляция Т-клеток анти-CD3 антителами; (3) генетическая модификация 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 сокультивирования 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].

Доноры. Забор венозной крови у шести здоровых доноров был одобрен локальным этическим комитетом НИИФКИ Минобрнауки России (протокол №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).

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. 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. Шику (Медицинская школа университета Миэ, Япония).

Получение NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитов

1. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови. У каждого донора осуществляли забор периферической венозной крови в объёме 25 мл. Мононуклеарные клетки периферической крови (МНК ПК) выделяли центрифугированием в градиенте плотности фиколла-урографина ($\rho = 1,077$ г/мл) (PanEco, Москва, Россия).

2. Стимуляция пролиферации Т-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 $0,5 - 1 \times 10^6$ 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.

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).

Клеточные линии. Клеточные линии меланомы человека SK-Mel-37 и NW-Mel-38, экспрессирующие опухолевый антиген NY-ESO-1, а также линия 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 mM L-глутамином (Biolot, Россия), 5×10^{-5} mM меркаптоэтанолом (Sigma, США), 25 mM HEPES (Sigma, США), 80 мкг/мл гентамицина (Krka, Словения) и 100 мкг/мл ампициллина (Синтез, Россия). Опухолевые клетки рассаживали в 96-луночные планшеты (TPP, Швейцария) ($4-5 \times 10^3$ клеток/лунку) и инкубировали в течение 16–17 часов перед последующим ссаживанием с трансдуцированными Т-клетками. Экспрессию NY-ESO-1 подтверждали методом проточной цитометрии с использованием PE-конъюгированных моноклональных антител кролика (клон D1Q2U, #65699, Cell Signaling Technology, США) согласно протоколу производителя.

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), предоставленные проф. Х. Шику (Медицинская школа университета Миэ, Япония), конъюгированные со стрептавидином-

PE (BioLegend, США). Трансдуцированные и нетрансдуцированные (контрольные) клетки последовательно инкубировали с тетрамерами (разведение 1:100, 20 мин, комнатная температура, в темноте), стрептавидином-PE (1:600, BioLegend, США) с последующим многоцветным окрашиванием. Использовали панель моноклональных антител к антигенам человека (BioLegend, США): анти-CD3-AF700 (#300324), анти-CD8-PerCPy7 (#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 сокультуре 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): 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.

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 дедбриса (FSC-A/SSC-A), отбор синглетов (FSC-H/FSC-A), селекцию жизнеспособных CD3⁺ лимфоцитов и идентификацию МНС-тетрамер-позитивных трансдуцированных Т-клеток. 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 [Hao Y. et al., 2024] по аналогии с пайплайном одноклеточной транскриптомики (scRNA-seq). После фильтрации данных (nCount_ADТ <106) выполняли нормализацию методом Centered Log-Ratio (CLR). Снижение размерности осуществляли с помощью анализа главных компонент (PCA) с последующей коррекцией пакетных эффектов алгоритмом Harmony [Korsunsky et al., 2019]. 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. 2020, с последующей кластеризацией алгоритмом HSNE (Hierarchical Stochastic Neighbor Embedding) в Cytosplore. 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).

Оценка цитотоксической активности in vitro. Цитотоксическую активность генномодифицированных Т-лимфоцитов оценивали колориметрическим 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). В плоскодонные 96-луночные планшеты высевали по 4×10³ 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. 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.

Количественная оценка продукции цитокинов. Для анализа цитокинового профиля TCR-трансдуцированные Т-лимфоциты 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) (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.

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 охлажденном 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 IL-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). Полученные клетки использовали для выделения РНК и проведения NanoString-анализа.

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.

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, и (3) трансдуцированные Т-клетки после культивирования 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: $(\bar{X}_{\text{NEG}} + 2 \times \text{SD}_{\text{NEG}}) + \bar{X}_{\text{POS_E}}$, где \bar{X}_{NEG} и SD_{NEG} - среднее значение и стандартное отклонение отрицательных контролей ($n = 8$), $\bar{X}_{\text{POS_E}}$ - среднее значение положительных контролей POS_E ($n = 6$). Гены с уровнем экспрессии ниже рассчитанного порога исключали из анализа как неэкспрессируемые. Нормализованные данные \log_2 -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 [Fang Z. et al., 2023], что позволило выявить значимые функциональные пути и биологические процессы, ассоциированные с наблюдаемыми изменениями экспрессии генов.

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). 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 объема опухоли), проводили эвтаназию согласно установленным этическим протоколам — путём передозировки CO_2 с последующей цервикальной дислокацией. Объем опухоли измеряли штангенциркулем и рассчитывали по формуле: $V = a \times b^2 \times 0,52$, где a — длина, b — ширина новообразования. При достижении среднего объема опухоли 100 мм^3 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).

Анализ экспрессии NY-ESO-1-специфичного TCR и выделение Т-лимфоцитов из модели ксенотрансплантата меланомы. На 14-е сутки после введения мышам трансдуцированных Т-клеток в модели ксенотрансплантата клеток меланомы SK-Mel-37, проводили забор периферической крови (до 1 мл) в пробирки с ЭДТА. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (МНК ПК) осуществляли методом градиентного центрифугирования с использованием фиколла-урографина ($\rho = 1,077$ 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. CD3⁺ Т-лимфоциты из пула МНК ПК выделяли магнитной сортировкой с использованием 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).

Подготовка образцов для single-cell анализа на платформе BD Rhapsody. Для проведения single-cell RNA-seq были отобраны две популяции Т-клеток: (1) пре-инфузионных 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.

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).

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. Демультиплексирование 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.

Контроль качества и анализ данных в Seurat. Анализ экспрессии генов проводили с использованием пакета Seurat V5 в среде программирования R. На первом этапе выполняли контроль качества данных, объединение образцов и нормализацию с применением пакета SCTransform [Hafemeister C. et al., 2019]. Для снижения размерности данных использовали метод главных компонент (PCA), после чего проводили коррекцию межгрупповых вариаций (batch effect) с помощью пакета Harmony [Korsunsky I. et al., 2019]. 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 [Gattinoni L. et al., 2017] и сигнатуре экспрессии генов, полученной при анализе данных NanoString. Демультиплексирование 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 [Fang Z. et al., 2023].

Результаты исследования и их обсуждение

Получение NY-ESO-1-специфичных TCR-модифицированных Т-лимфоцитов

Генетически модифицированные TCR-лимфоциты были получены из мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров. После активации и стимуляции клеток с помощью анти-CD3 и IL-2 клетки проводили трансдукцию ретровирусным вектором, кодирующим α - и β -цепи TCR, специфичного к эпитопу NY-ESO-1_{157–165} (HLA-A*02), и содержащим повышающие аффинность замены Gly⁵⁰→Ala и Ala⁵¹→Glu в CDR2-домене β -цепи. На 9-е сутки культивирования эффективность трансдукции оценивали по уровню связывания с МНС-тетрамерами, нагруженными эпитопом NY-ESO-1_{157–165}. Средняя доля Т-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.

Затем был проведен фенотипический анализ трансдуцированных NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-лимфоцитов ($n = 4$) методом многоцветной проточной цитометрии с использованием линейных маркеров (CD4, CD8), маркеров памяти (CD45RA, CD62L) и ингибиторных рецепторов (PD-1, TIM-3).

Визуализация с помощью алгоритма снижения размерности UMAP позволила выделить четыре фенотипически различимые субпопуляции: CD4⁺ наивные Т-клетки (CD62L⁺CD45RA⁺), CD8⁺ наивные Т-клетки (CD62L⁺CD45RA⁺), CD4⁺ терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти (TE; CD62L⁻CD45RA⁺) и CD8⁺ терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти (TE; CD62L⁻CD45RA⁺) (Рисунок 2А, С). 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 — $12,53 \pm 3,19$ % от общего числа трансдуцированных клеток (Рисунок 2Б).

Анализ экспрессии ингибиторных молекул выявил четкую зависимость от стадии дифференцировки Т-клеток. Коэкспрессия 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 она отсутствовала. При этом в наивных CD4⁺ Т-клетках обнаруживалась экспрессия TIM-3, а в наивных CD8⁺ — PD-1 (Рисунок 2Г). Наблюдаемый профиль экспрессии согласуется с данными о том, что экспрессия ингибиторных рецепторов зависит прежде всего от дифференцировки и активации клеток, а не от их функционального истощения [Legat et al., 2013].

Важно, что значительная доля клеток сохранила наивный фенотип, что благоприятно для адоптивной клеточной терапии [Golubovskaya et al., 2016], поскольку известно, что с увеличением степени зрелости от наивных до терминально-дифференцированных Т-лимфоцитов снижается их способность к самоподдержанию и пролиферации [Mahnke et al., 2013]. При этом наличие субпопуляции терминально дифференцированных клеток памяти, способных к немедленной продукции воспалительных цитокинов и цитотоксичности, обеспечивает готовность к быстрому иммунному ответу.

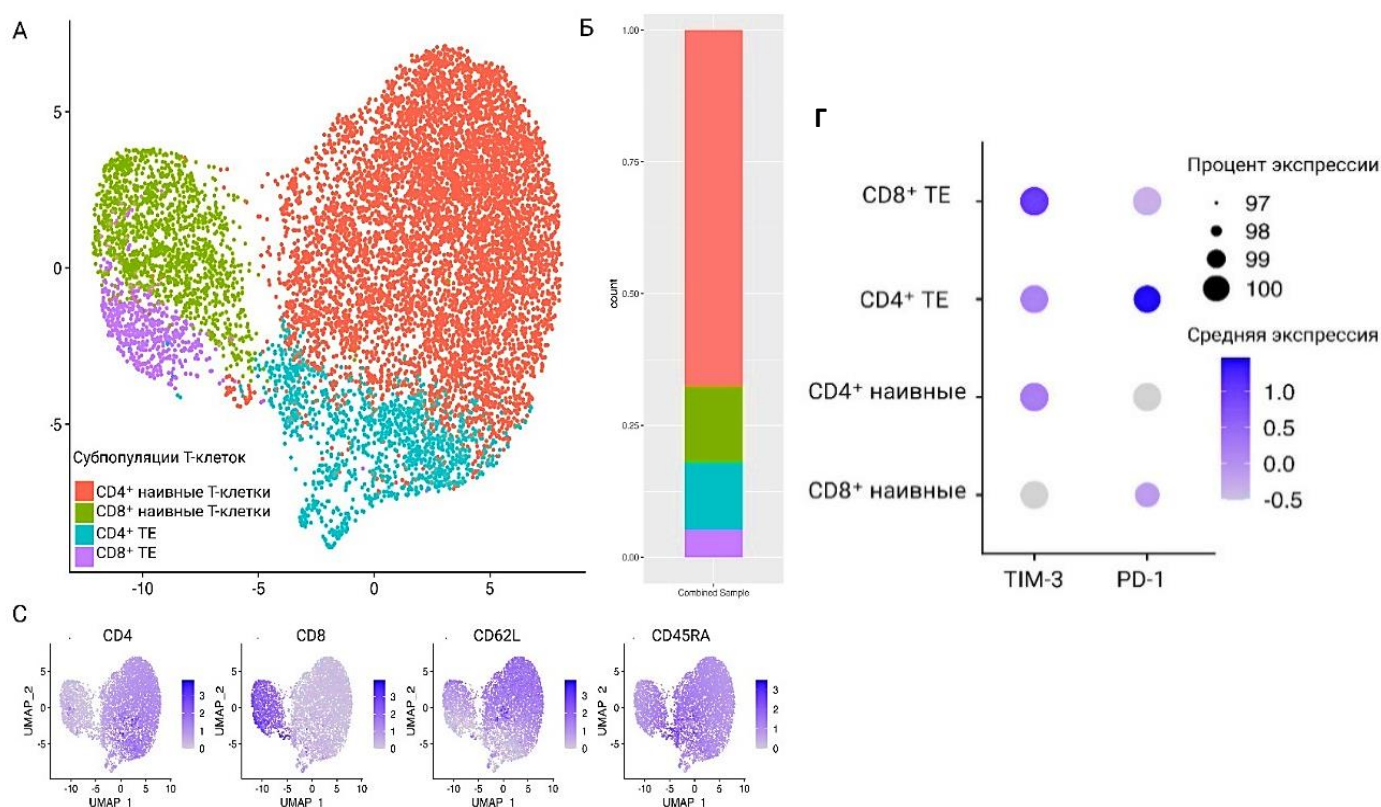


Рисунок 2 — Иммунофенотипический анализ NY-ESO-1-специфичных TCR-T-лимфоцитов методом проточной цитометрии. (А) UMAP-визуализация клеточных кластеров, отражающая пространственное распределение отдельных клеток на основе уровня экспрессии маркеров CD4, CD8, CD45RA и CD62L. (Б) Количественное распределение субпопуляций. Столбчатая диаграмма, демонстрирующая процентное соотношение выделенных субпопуляций (среднее ± стандартное отклонение, n = 4). (С) Экспрессия кластер-определяющих маркеров. (Г) 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 уровню экспрессии от низкой (светло-синий) до высокой (темно-синий); TE — терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти.

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

С целью более глубокой молекулярной характеристики полученного клеточного продукта был проведён транскриптомный анализ NY-ESO-1-специфичных TCR-T-лимфоцитов. На первом этапе проведена сортировка антиген-специфичных Т-лимфоцитов с использованием МНС-тетрамеров, нагруженных пептидом NY-ESO-1. 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).

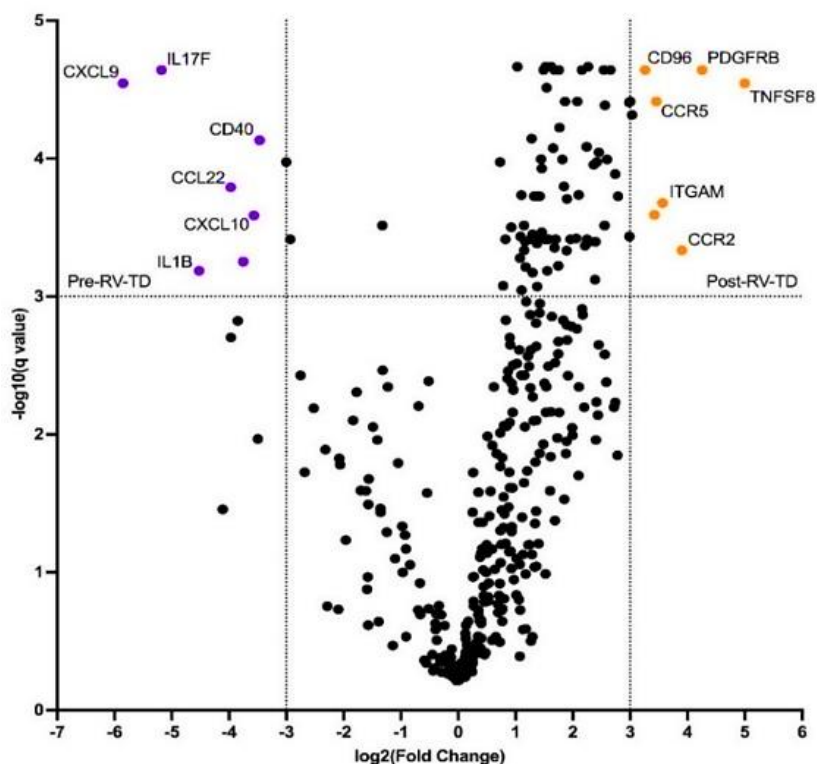


Рисунок 3 — Volcano-plot анализа дифференциальной экспрессии генов в NY-ESO-1-специфичных TCR-T-лимфоцитах. Оранжевыми точками обозначены гены с повышенной экспрессией ($\log_2FC > 3,0$ при $q < 0,001$), фиолетовыми — с пониженной экспрессией ($\log_2FC < -3,0$ при $q < 0,001$), чёрным — гены без статистически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

Для оценки ранних транскриптомных изменений при взаимодействии с опухолевыми клетками был проведён сравнительный анализ до и после двухчасового культивирования с NY-ESO-1-положительной клеток линией SK-Mel-37. После инкубации выполнена сортировка CD45⁺ клеток для исключения контаминации опухолевой РНК. Анализ показал значительное повышение экспрессии ряда генов. Для функциональной интерпретации этих изменений был применен анализ обогащения наборов генов (GSEA), который продемонстрировал активацию ключевых сигнальных путей: сигнального пути интерферона- γ , позитивной регуляции активации Т-клеток и регуляции пролиферации Т-лимфоцитов (Рисунок 4).

Параллельно обнаружено снижение экспрессии генов (Таблица 1), включая компоненты TCR-сигнального комплекса (*CD3E*, *CD8A*, *CD247* (CD3- ζ), *CD4*, *CD27*, *CD28*, *ZAP70* и *LCK*), что свидетельствует о модуляции TCR-сигналинга, предотвращающей избыточную стимуляцию *in vitro*. Также отмечено снижение экспрессии регуляторных генов (*FOXP3*, *TGFB1*, *CTLA-4*), что позволяет предположить возможное снижение иммуносупрессивного потенциала данной популяции.

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

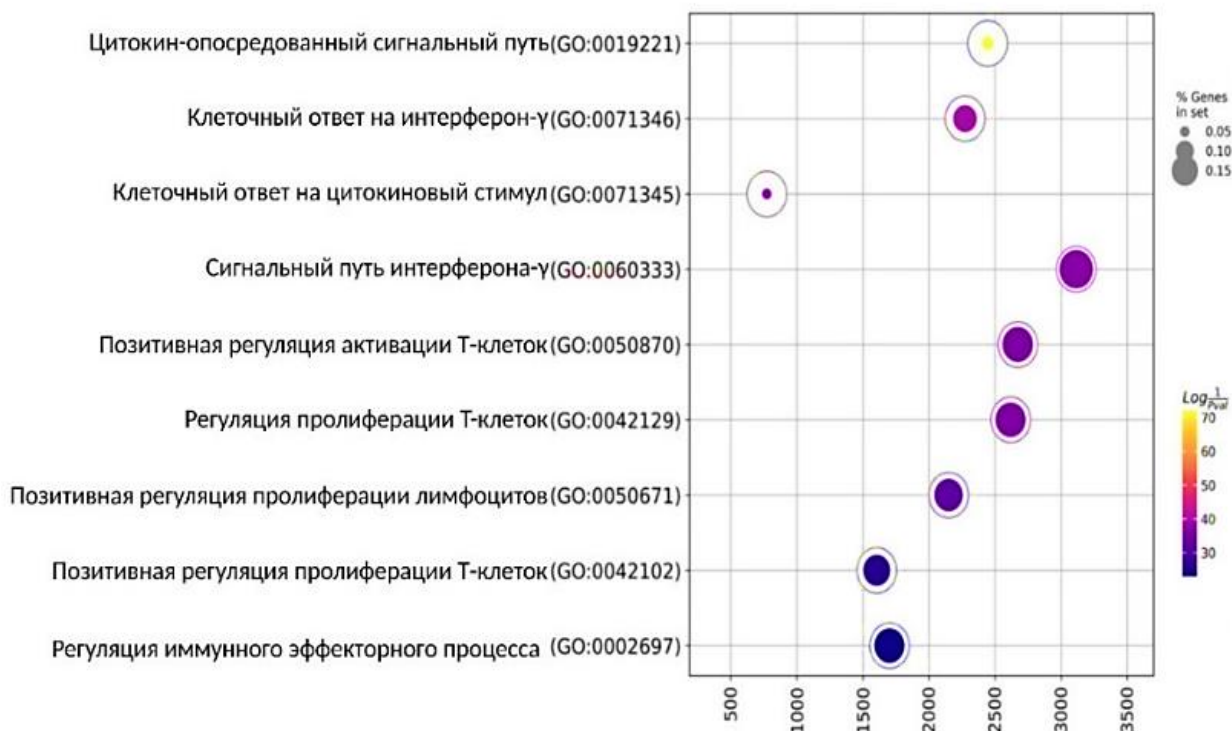


Рисунок 4 — GSEA-анализ биологических процессов, ассоциированных с повышенной экспрессией генов в NY-ESO-1-специфичных TCR-T-клетках после 2-часового сокультивирования с опухолевой клеточной линией SK-Mel-37. Цвет кругов соответствует степени значимости (желтые оттенки — более значимые), а размер кругов пропорционален доле генов, вовлечённых в соответствующий биологический процесс по данным аннотаций Gene Ontology. Полные результаты приведены в Таблице 2.

Таблица .1 — Гены со сниженной экспрессией в NY-ESO-1-специфичных TCR-T-лимфоцитах после культивирования с клеточной линией меланомы SK-Mel-37

ADA, ARHGDIB, 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, PECAM1, PRDM1, PRF1, PSMB10, PSMB8, PSMB9, PTGER4, PTPN22, PTPN6, PYCARD, RARRES3, SIPRI, SELL, SELPLG, SH2D1A, SIGIRR, SLAMF1, SLAMF7, SOCS1, STAT4, STAT5A, STAT5B, TAGAP, TBX21, TGFB1, TGFB2, TL1R, TMEM173, TNFRSF11A, TNFRSF14, TNFRSF1B, TNFSF10, TNFSF12, TNFSF4, TNFSF8, TP53, TRAF5, TYK2, UBE2L3, ZAP70.

Таблица 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, NFKBIA, 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>
Клеточный ответ на цитокиновый стимул	23/482	0.0	772.551	<i>CSF1, CCL20, IFNGR1, LIF, FN1, CXCL1, IL1RAP, CXCL2, ICAM1, 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, ICAM1, IRF1, HLA-DPB1, HLA-DRA, NCAM1, 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>
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, C1S, CD81, CIR, CIQBP, CFI, HLA-DRA, CD59, HLA-DRB1</i>

Примечание: q-value <0,000001

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

На следующем этапе работы оценивали цитотоксическую активность NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-клеток *in vitro* 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 5, NY-ESO-1-TCR-Т-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-Т-клетки лизировали NY-ESO-1-положительные линии значительно эффективнее, чем NY-ESO-1-негативную линию.

Полученные данные подтверждают антиген-специфическую цитотоксичность TCR-Т-клеток, опосредованную распознаванием NY-ESO-1.

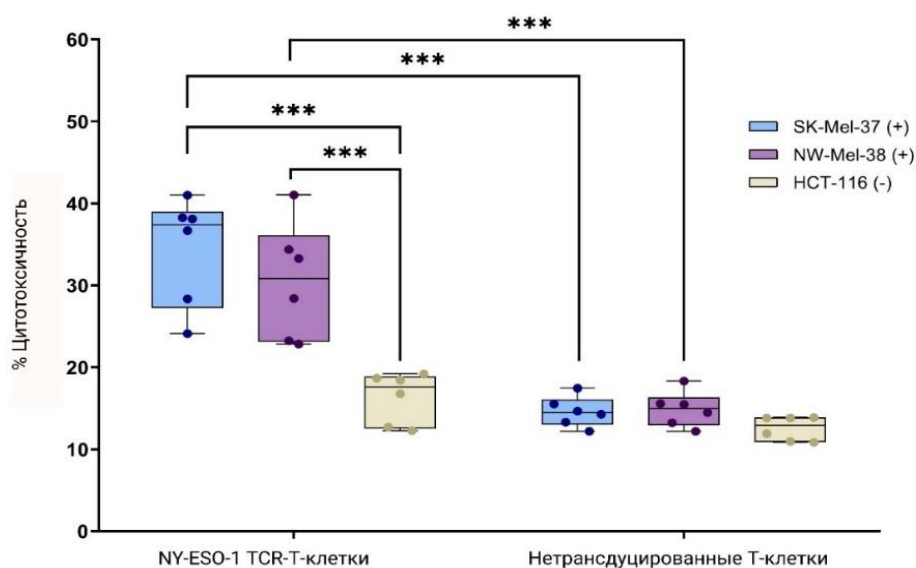


Рисунок 5 — Цитотоксическая активность TCR-Т-лимфоцитов в отношении опухолевых клеток с различной экспрессией NY-ESO-1 (n = 6). Цитотоксичность оценивалась по уровню ЛДГ после 6–8 часов совместного культивирования при соотношении эффектор:мишень 5:1. Клеточные линии: SK-Mel-37⁺ и NW-Mel-38⁺ (NY-ESO-1⁺),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

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

Через 4–5 часов со-культивирования TCR-Т-лимфоцитов с клетками линии SK-Mel-37 (NY-ESO-1⁺) был проведён многоцветный анализ экспрессии маркеров цитотоксичности и активации CD8⁺ Т-лимфоцитов с использованием алгоритма HSNE. В результате кластерного анализа были идентифицированы три основные субпопуляции CD8⁺ Т-лимфоцитов, при этом наибольшую долю (67,50 ± 3,89%; n = 6) составляла популяция с коэкспрессией маркера дегрануляции CD107a⁺ и индуктора апоптоза FasL⁺ (Рисунок 6).

Для оценки продукции цитокинов и цитотоксических молекул была проанализирована секреторная активность NY-ESO-1-специфичных TCR-модифицированных и нетрансдуцированных (контрольных) Т-лимфоцитов после 48-часового сокультивирования с NY-ESO-1-положительной опухолевой клеточной линией SK-Mel-37. Мультиплексный анализ с использованием панели LEGENDplex™ продемонстрировал достоверное повышение продукции гранзима В, гранзима А, гранулина, перфорина, IFN-γ, TNF-α, растворимого Fas-лиганда (sFasL), а также интерлейкинов IL-6 и IL-17 в культуре трансдуцированных Т-лимфоцитов по сравнению с контролем (Рисунок 7). Полученные данные свидетельствуют об активации основных механизмов Т-клеточной цитотоксичности: перфорин-гранзимового, Fas/FasL-опосредованного

и цитокин-зависимого путей, что подтверждает высокий функциональный потенциал NY-ESO-1-специфичных TCR-T-лимфоцитов.

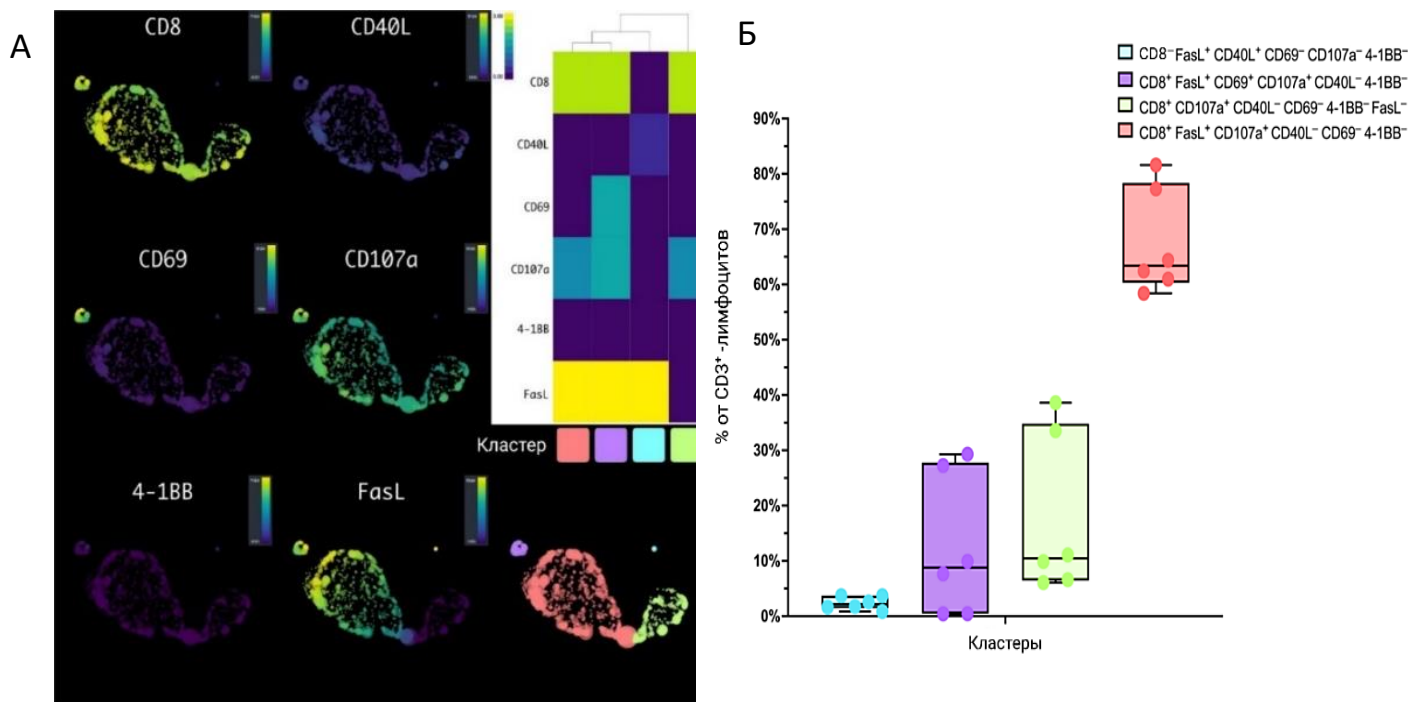


Рисунок 6 — Анализ экспрессии маркеров цитотоксичности и активации NY-ESO-1-специфичных CD8⁺ TCR-модифицированных Т-лимфоцитов после сокультивирования с NY-ESO-1⁺ клетками опухолевой линии SK-Mel-37 в соотношении эффектор:мишень 5:1 в течение 4–5 ч (n=6). (А) HSNE - визуализация клеточных кластеров, отражающая пространственное распределение отдельных клеток на основе уровня экспрессии маркеров (CD8, CD40L, CD69, CD107a, 4-1BB, FasL). Интенсивность экспрессии маркеров показана цветовой шкалой: фиолетовый — низкая экспрессия, жёлтый — высокая экспрессия. Кластеры обозначены цветами (красный, фиолетовый, синий, зелёный,) в соответствии с тепловой картой. (Б) Количественное распределение субпопуляций. Процентное соотношение выявленных кластеров NY-ESO-1-специфичных CD8⁺ TCR-модифицированных Т-клеток. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM).

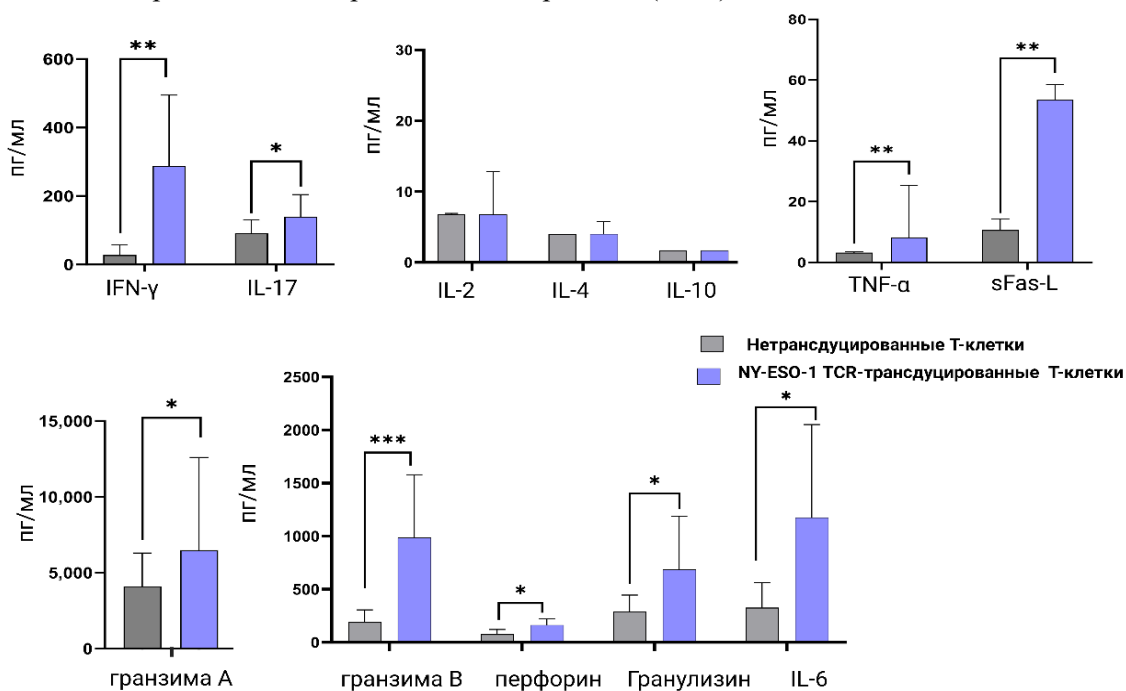


Рисунок 7 — Продукция цитокинов NY-ESO-1-специфичными TCR-T-клетками и нетрансдуцированными Т-клетками при сокультивировании с клеточной линией SK-Mel-37 (NY-

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.

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

Для оценки *in vivo* 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 объема 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 8). Полученные результаты подтверждают высокую эффективность NY-ESO-1-TCR-T-клеток против NY-ESO-1⁺-опухолей.

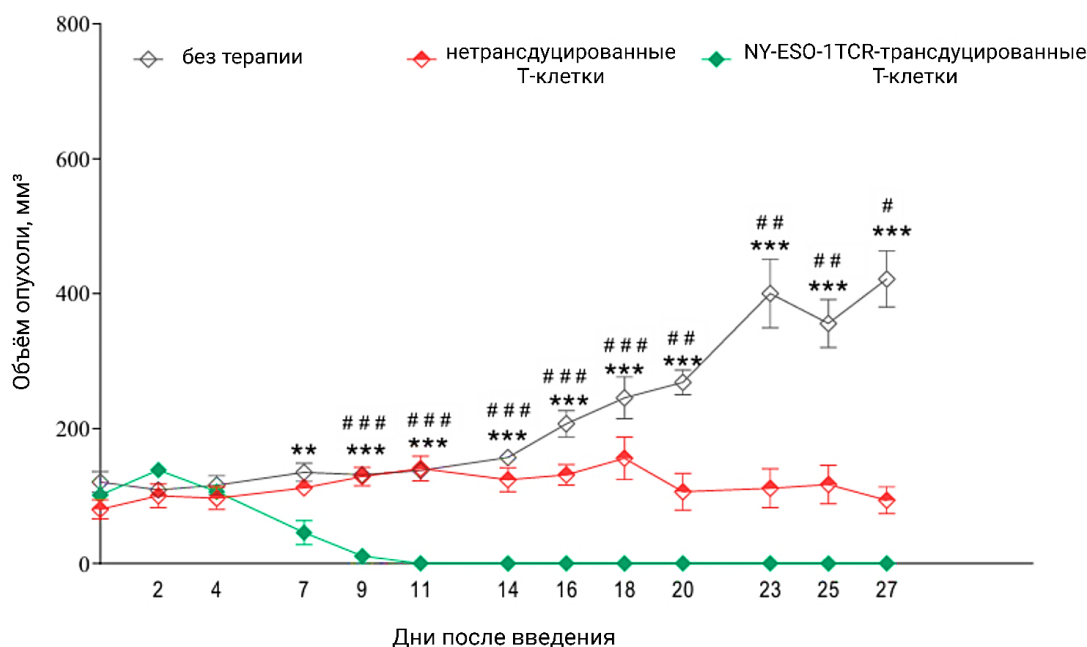


Рисунок 8 — Ингибирование роста опухоли Т-клетками, трансдуцированными TCR, специфичными к антигену NY-ESO-1, в модели ксенотрансплантата меланомы. Мышам линии NRG (n = 24) подкожно имплантировали клетки опухолевой линии SK-Mel-37 (5×10⁶ на мышь). При достижении объема опухоли 80–100 мм³ животным вводили: контрольной группе — нетрансдуцированные Т-клетки, экспериментальной — Т-клетки, трансдуцированные NY-ESO-1-специфичным TCR (8×10⁶ клеток на мышь, внутривенно); интактная группа оставалась без лечения. Статистическую значимость различий оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с критерием множественных сравнений по Тьюки (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.

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

На 14-е сутки после инфузии у животных экспериментальной группы проводили забор периферической крови. Методом проточной цитометрии с использованием МНС-тетрамеров HLA-

A*02:01/NY-ESO-1 и антител к человеческому CD3 подтверждена экспрессия трансдуцированного TCR *in vivo*: доля CD3⁺тетрамер-позитивных клеток сохранялась на уровне исходной популяции.

С целью оценки функционального статуса NY-ESO-1-специфичных TCR-трансдуцированных Т-лимфоцитов в модели ксенотрансплантата меланомы SK-Mel-37 было проведено одноклеточное РНК-секвенирование (scRNA-seq) двух групп клеток: (1) NY-ESO-1-специфичные TCR-трансдуцированные Т-лимфоциты до их инфузии мышам (Контроль-Т-клетки) и (2) Т-лимфоциты, выделенные из периферической крови мышей через 14 дней после инфузии трансдуцированных клеток (ПК-Т-клетки).

Кластерный анализ экспрессии генов выявил шесть субпопуляций Т-лимфоцитов: CD4⁺ и CD8⁺ наивные (CCR7⁺ IL7R⁺), CD4⁺ и CD8⁺ эффекторные клетки памяти (EM; CCR7⁻ IL7R^{+/-}), CD8⁺ терминально дифференцированные эффекторные клетки памяти (TE; CCR7⁻ IL7R⁻) и пролиферирующие Т-клетки, определяемые по экспрессии TYMS (Рисунок 9 А,С).

Особый интерес представляет выявление коэкспрессии генов 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 (Рисунок 3). Количественный анализ субпопуляционного состава показал значительное увеличение доли CD4⁺ EM и CD8⁺ TE в ПК-Т-клетках при снижении доли CD8⁺ EM по сравнению с контрольными Т-клетками (Рисунок 9 Б).

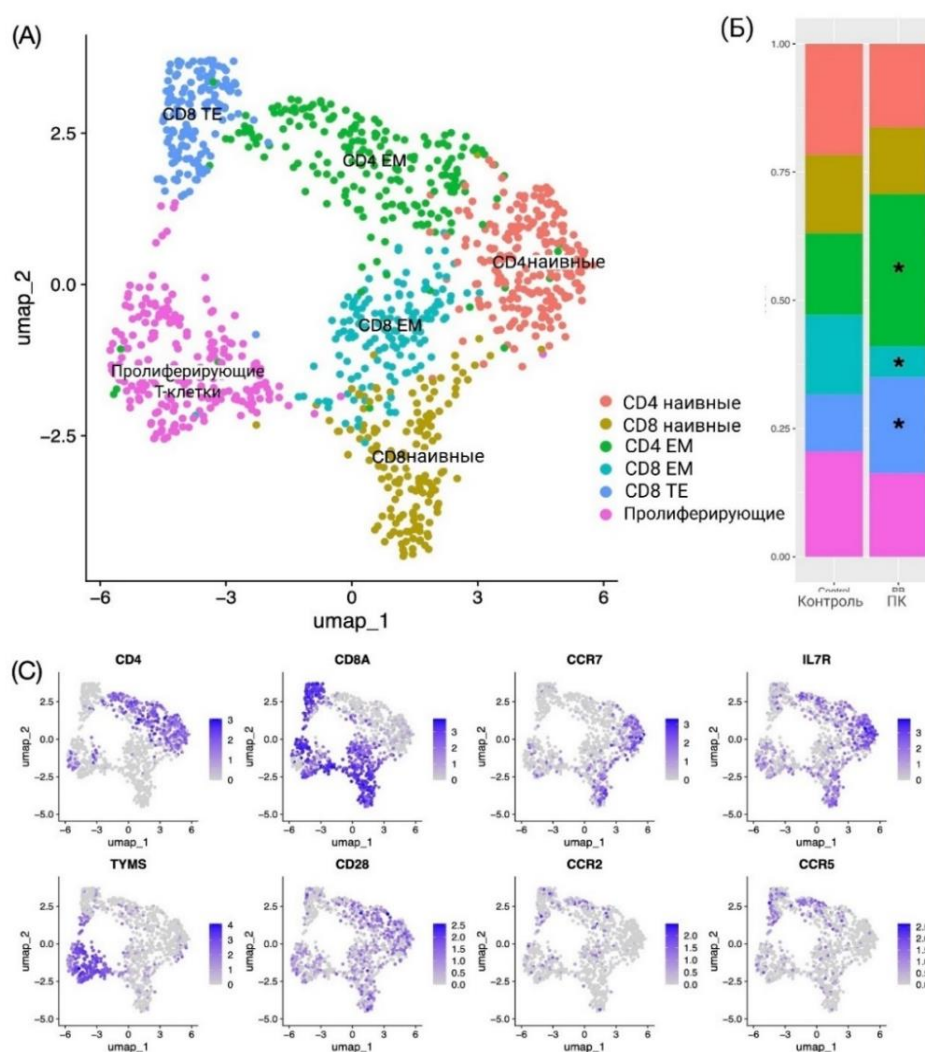


Рисунок 9 — Одноклеточный анализ экспрессии генов в NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-клетках. (А) Пространственное распределение клеточных кластеров. Точечные графики (UMAP-проекция), отображающие положение отдельных клеток в соответствии с их транскриптомными профилями. (Б) Количественное распределение Т-клеточных субпопуляций. Столбчатая диаграмма, демонстрирующая процентное соотношение клеток в каждом кластере (данные представлены как среднее ± 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 дифференциальной экспрессии генов подтвердил функциональную перестройку выявленных популяций. Наиболее выраженные изменения были характерны для субпопуляции CD8⁺ ТЕ-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 (*GZML*). 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*) (Рисунок 10). Эти данные позволяют предположить, что CD8⁺ ТЕ-клетки, экспрессирующие TCR к NY-ESO-1, обладают не только TCR-зависимой цитотоксической активностью, но и потенциально способны к реализации TCR-независимых механизмов, таких как активация через рецептор *NKG2D* (*KLRK1*), распознающий стресс-индуцированные лиганды на опухолевых клетках, и антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), опосредованная рецептором *CD16a* (*FCGR3A*).

Одновременно наблюдалось повышение экспрессии генов ингибиторных рецепторов *LAG3*, *KLRG1*, *KLRC1* (*NKG2A*) и *CD300A*, что указывает на наличие регуляторных механизмов, модулирующих цитотоксическую активность NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-клеток. Выявленный профиль экспрессии предполагает, что блокада ингибиторных рецепторов, таких как *NKG2A*, в рамках комбинированной терапии может повысить эффективность TCR-Т-клеток в условиях иммуносупрессивного микроокружения.

В субпопуляции CD4⁺ EM наблюдался аналогичный, но менее выраженный транскрипционный профиль, включая повышение *PRF1*, *GZML*, *GZMH* и *GZMB*, что указывает на потенциальную цитотоксическую активность и расширяет репертуар эффекторных клеток, способных участвовать в TCR-опосредованном лизисе опухоли (Рисунок 10).

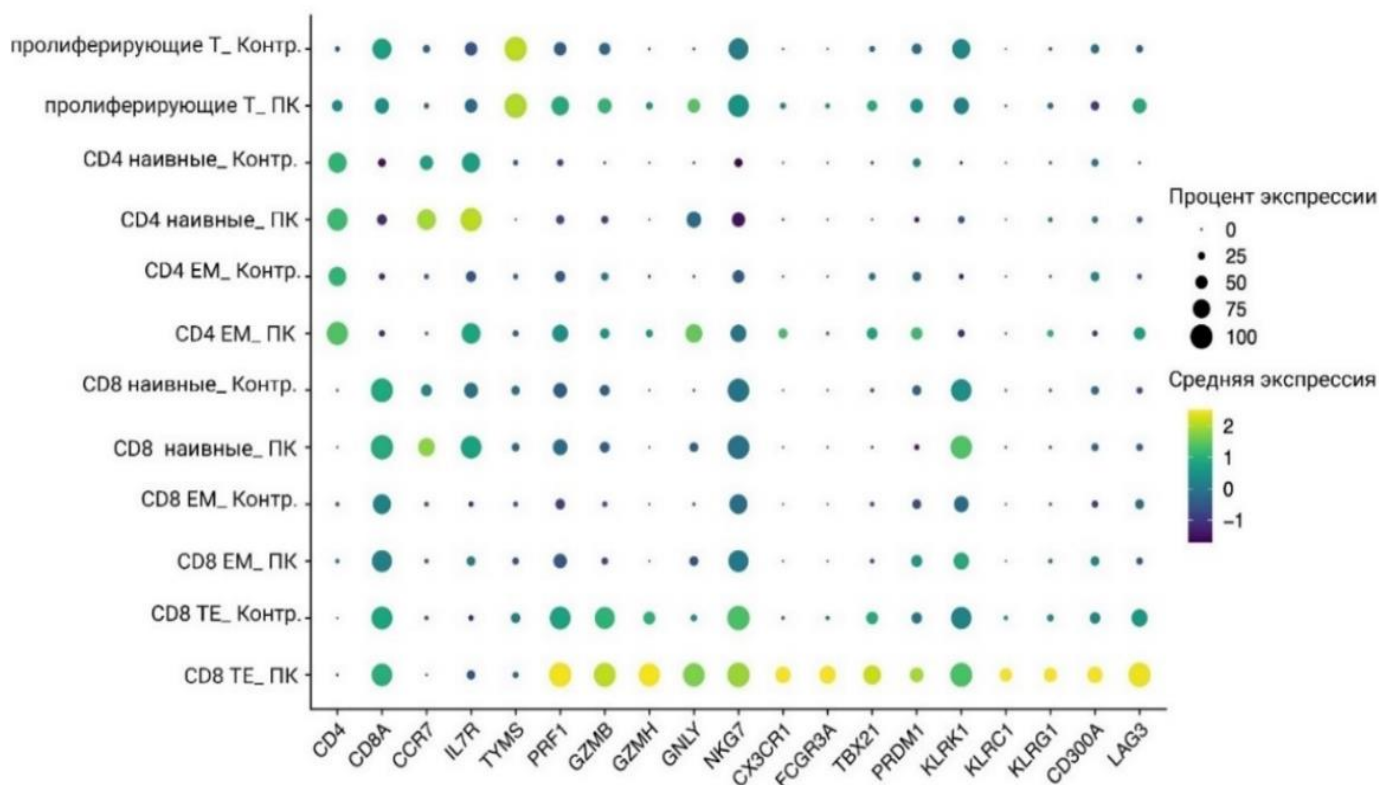


Рисунок 10 — Точечный график дифференциальной экспрессии генов в субпопуляциях NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-клеток. Размер точек пропорционален доле клеток в кластере, экспрессирующей соответствующий ген, а цветовая шкала (Z-оценка) отражает уровень экспрессии: от тёмно-фиолетового (минимум) до жёлтого (максимум). EM – эффекторные Т-клетки памяти; ТЕ – терминально-дифференцированные Т-клетки памяти; Контроль – Т-клетки, трансдуцированные NY-ESO-1 TCR (n = 4); ПК – Т-клетки периферической крови через 14 суток после инфузии (n = 4).

Анализ обогащения наборов генов (GSEA), ассоциированных с повышенной экспрессией в CD8⁺ ТЕ-клетках периферической крови, подтвердил достоверное обогащение NK-ассоциированных биологических процессов, таких как дегрануляция, цитотоксичность и иммунный ответ (Рисунок 11). Эти данные подчеркивает их ключевую роль TCR-трансдуцированных CD8⁺ ТЕ-клеток в эффективной элиминации опухолевых клеток *in vivo*.

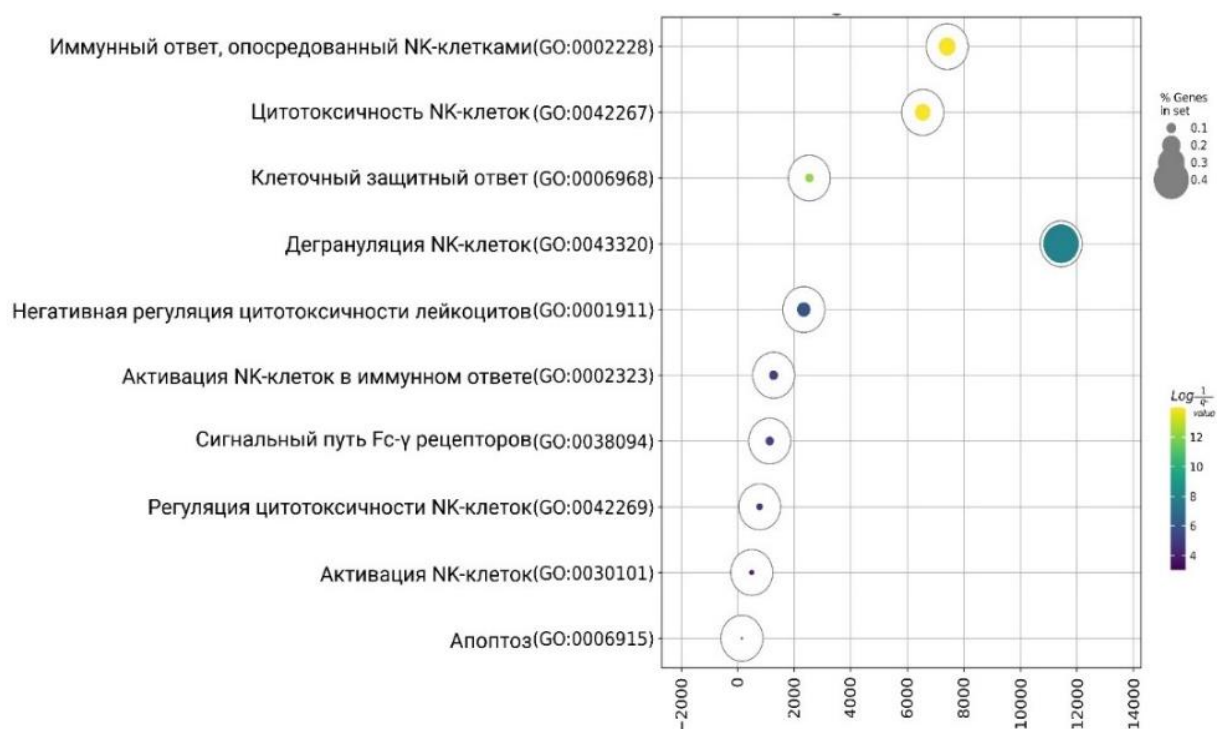


Рисунок 11 — GSEA-анализ биологических процессов, ассоциированных с повышенной экспрессией генов в CD8⁺ ТЕ-клетках периферической крови. Цвет кругов соответствует степени значимости (желтые оттенки — более значимые), а размер кругов пропорционален доле генов, вовлечённых в соответствующий биологический процесс по данным аннотаций Gene Ontology.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе проведён комплексный анализ функциональных характеристик TCR-модифицированных Т-лимфоцитов, специфичных к опухоли-ассоциированному 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 рMS3-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 PD-1 и TIM-3 от стадии дифференцировки Т-клеток.

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*, *TGFBI*, *CTLA-4*).

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).

Введение NY-ESO-1-специфичных TCR-T-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⁺ ТЕ-клеток, экспрессирующих гены цитотоксических молекул (*PRF1*, *GZMB*, *GZMH*, *GZML*, *GZLN*) и рецепторов, характерных для NK-клеток (*KLRK1*, *FCGR3A*, *NKG7*), а также CD4⁺ EM-клеток с экспрессией гены 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-T-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-T-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-T-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-T-клетки: терминально дифференцированные эффекторные CD8⁺ Т-клетки памяти с высокой экспрессией цитотоксических молекул (*PRF1*, *GZMB*, *GZMH*, *GZML*, *GZLN*), рецепторов NK-клеток (*KLRK1*, *FCGR3A*, *NKG7*) и ингибиторных молекул (*KLRG1*, *CD300A*, *LAG3*), а также CD4⁺ эффекторные Т-клетки памяти с экспрессией маркеров цитотоксической активности (*PRF1*, *GZMB*, *GZMH*), что свидетельствует об их участии в противоопухолевом иммунном ответе.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Alsalloum A.**, Shevchenko J.A., Sennikov S. NY-ESO-1 antigen: A promising frontier in cancer immunotherapy // Clin. Transl. Med. — 2024. — Vol. 14. — № 9. — P. e70020. DOI: 10.1002/ctm2.70020

2. **Alsalloum A.**, Alrhoun S., Perik-Zavodskaja O., Fisher M., Volynets M., Lopatnikova J., Perik-Zavodskii R., Shevchenko J., Philippova J., Solovieva O., Zavjalov E., Kurilin V., Shiku H., Silkov A., Sennikov S. 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. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1507218

2. **Alsalloum A.**, Alrhoun S., Shevchenko J., Fisher M., Philippova J., Perik-Zavodskii R., Perik-Zavodskaja O., Lopatnikova J., Kurilin V., Volynets M., Akahori Y., Shiku H., Silkov A., Sennikov S. TCR-Engineered Lymphocytes Targeting NY-ESO-1: In Vitro Assessment of Cytotoxicity against Tumors // Biomedicines. — 2023. — Vol. 11. — № 10. — P. 2805. DOI: 10.3390/biomedicines11102805.

4. Кузнецова М.С., Терещенко В.П., Шевченко Ю.А., Фишер М.С., Курилин В.В., Алсаллум А., Алрхмун С., Акахори Я., Шикю Х., Сенников С.В. Фенотипические и функциональные особенности генерированных *in vitro* TCR-T-клеток, специфичных к опухоль-ассоциированному антигену NY-ESO-1 // Иммунология. — 2022. — Т. 43. — № 5. — С. 536-547. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2022-43-5-536-547>.

Список используемых сокращений

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)
FAS — рецептор Fas (англ. Fas receptor)
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)
IFN — интерферон (англ. interferon)
IL — интерлейкин (англ. interleukin)
HLA — антигены тканевой совместимости (англ. human leukocyte antigen)
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)
NK — 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)
TGF — трансформирующий фактор роста (англ. transforming growth factor)
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)
TYMS — тимидилатсинтазы, ключевого фермента синтеза ДНК, необходимого для пролиферации клеток (англ. Thymidylate synthase)
Zap — зета-цепь-ассоциированная протеинкиназа (англ. ζ-associated protein kinase)