

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ВАКЦИН И СЫВОРОТОК ИМ. И. И. МЕЧНИКОВА»

На правах рукописи

Фёдорова Полина Олеговна



**Оптимизация метода обогащения и экспансии популяций
натуральных киллеров и НКТ-клеток с возможностью
последующей генетической модификации химерным рецептором CAR**

3.2.7. Иммунология

1.5.10. Вирусология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Маркушин Станислав Георгиевич

кандидат биологических наук

Чикилева Ирина Олеговна

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Подходы к лечению онкологических заболеваний	15
1.2. Концепция иммуноредактирования, иммунотерапия онкологических заболеваний.....	16
1.3. Ингибиторы иммунных контрольных точек и противоопухолевые вакцины.	19
1.4. Адоптивная клеточная терапия.....	25
1.5. Строение CAR-рецептора.....	29
1.6. Различные поколения CAR	32
1.7. Методы генетической модификации лимфоцитов	36
1.8. Виды CAR-терапии	40
1.9. CAR-НК- и CAR-НКТ-терапия.....	47
1.10. Источники получения НК-клеток.....	50
1.11. Получение CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток <i>in vitro</i>	53
1.12. Получение БМКП на основе CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток, перспективы и текущие ограничения технологии	60
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	63
2.1. Характеристика используемых материалов	63
2.2. Характеристика используемых методов.....	64
2.2.1. Характеристика плазмид	65
2.2.2. Характеристика культур клеток	65
2.2.3. Трансформация бактерий и выращивание ночной культуры.....	66
2.2.4. Выделение плазмидной ДНК	66
2.2.5. Электрофорез в агарозном геле	67
2.2.6. Трансфекция клеток НЕК 293Т	67
2.2.7. Концентрирование лентивирусов.....	68
2.2.8. Определение функционального титра лентивирусов.....	69
2.2.9. Выделение МПК из периферической крови и лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата.....	70
2.2.10. Магнитная сепарация.....	71

2.2.11. Сорбция МАТ для последующей активации МПК	71
2.2.12. Обработка клеточной линии НЕК 293Т Митомицином С.....	72
2.2.13. Активация МПК	72
2.2.14. Активация CD4+ и CD8+ лимфоцитов	74
2.2.15. Трансдукция лимфоцитов	74
2.2.16. Культивирование лимфоцитов и CAR-лимфоцитов	75
2.2.17. Селекция CAR-лимфоцитов.....	75
2.2.18. Определение пролиферации клеток с помощью N-сукцинимидилового эфира 6-карбоксихлорофлуоресцеина (CFSE)	76
2.2.19. Определение числа лимфоцитов	76
2.2.20. Проточная цитофлуориметрия.....	77
2.2.21. Цитотоксический тест.....	78
2.2.22. Статистическая обработка данных.....	80
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	81
3.1. Воздействие различных комбинаций интерлейкинов на пролиферацию и цитотоксичность НК- и НКТ-клеток.....	82
3.2. Особенности экспансии и фенотипических характеристик первичной культуры МПК человека под действием различных активаторов пролиферации .	89
3.2.1. Оценка действия активаторов в первые сутки после активации	90
3.2.2. Оценка пролиферации и цитотоксической активности первичной культуры МПК при длительном культивировании после стимуляции различными активаторами пролиферации.....	96
3.2.3. Анализ иммунофенотипа первичной культуры лимфоцитов при длительном культивировании после стимуляции различными активаторами пролиферации ..	98
3.3. Оптимизация методики использования клеточной линии НЕК 293Т в качестве фидерных клеток для экспансии НК- и НКТ-клеток.....	104
3.3.1. Методы активации первичной культуры лимфоцитов, включающие активацию МАТ и соинкубацию с НЕК 293Т.....	104
3.3.2. Активация лимфоцитов клеточной линией НЕК 293Т в начале культивирования	109
3.4. Подбор условий для осуществления эффективной лентивирусной трансдукции с целью получения CAR-лимфоцитов	116

3.4.1. Сравнение протоколов для трансфекции клеток НЕК 293Т и методик по концентрированию лентивирусов	117
3.4.2. Оценка эффективности лентивирусной трансдукции клеточной линии Jurkat и первичной культуры МПК	121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	127
ВЫВОДЫ	131
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	133
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	134
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	137
ПРИЛОЖЕНИЕ А	165
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	171
ПРИЛОЖЕНИЕ В	174

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Онкологические заболевания представляют собой опасную группу неинфекционных заболеваний, распространенных по всему миру и являющихся одной из ведущих причин смертности среди населения. Поиск эффективного способа лечения рака продолжается на протяжении последних пятидесяти лет, однако разработанные на данный момент методы терапии не способны гарантировать пациенту полное выздоровление [1]. Основными трудностями при разработке подходов к лечению являются быстрая эволюция опухолевых клеток, приводящая к устойчивости рака к проводимой терапии, недостаточность клинических испытаний химиотерапевтических препаратов или намеренное завышение их эффективности с целью выгодной продажи, а также сложное прогнозирование исходов лечения при применении комбинации лучевой терапии или химиотерапии с хирургическим вмешательством и воздействия этих терапевтических стратегий на иммунную систему пациента [1]. В связи с этим возникает необходимость в разработке современных методов терапии, позволяющих с одинаковой эффективностью бороться как с клетками первичного опухолевого очага, так и с клетками, циркулирующими в периферической крови и являющимися источником отдаленных метастазов.

На сегодняшний день одним из самых перспективных подходов к лечению онкологических заболеваний является иммунотерапия. В контексте иммунотерапии проводится разработка вакцин против рака, которые могут создаваться на основе дендритных или опухолевых клеток, опухолевых антигенов или нуклеиновых кислот [2]. Помимо противораковых вакцин разрабатываются и другие виды противораковой иммунотерапии: терапия опухолевыми инфильтрирующими лимфоцитами (TIL), терапия на основе химерного рецептора антигена (CAR-терапия), а также использование ингибиторов иммунных контрольных точек [2].

CAR-терапия основана на получении активированных и генетически модифицированных клеток иммунной системы, которые экспрессируют химерный рецептор антигена (CAR), что необходимо для опухолевого распознавания и реализации противоопухолевого иммунитета. CAR наделяют лимфоциты антиген-специфическим распознаванием, активацией и пролиферацией вне зависимости от главного комплекса гистосовместимости (МНС). Изначально при разработке CAR-технологии в качестве иммунных клеток-эффекторов использовались Т-лимфоциты, поскольку данные клетки можно получить от донора в большом количестве, и они способны к клональной экспансии. Однако сейчас многие отечественные и зарубежные исследователи фокусируют свое внимание на натуральных киллерах (НК-клетках), поскольку данная популяция обладает существенными преимуществами относительно Т-клеток. Дело в том, что при введении НК-клеток фактически исключается возможность развития реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [3]. Кроме того, НК-клетки не обладают выраженной цитотоксической активностью по отношению к нормальным клеткам органов и тканей (например, к клеткам печени, легких, почек, мышечной ткани и др.), что, в свою очередь, снижает уровень риска развития побочных эффектов от проводимой терапии [4]. Еще одним важным преимуществом является возможность использования аллогенного источника НК-клеток, поскольку зачастую при выборе аутологичного источника лимфоцитов у онкобольных пациентов наблюдаются качественные и количественные дефекты популяции НК-клеток [4]. Небольшая продолжительность жизни активированных НК-клеток и наличие поверхностных ингибиторных рецепторов, модулирующих функциональную активность, также вносят вклад в снижение риска развития побочных эффектов от иммунотерапии. Безопасность и эффективность применения аллогенных НК-клеток была продемонстрирована в клинических испытаниях, проводимых на различных моделях онкологических заболеваний [5].

Еще одним перспективным подходом к иммунотерапии с использованием генетически модифицированных иммунных клеток является использование

CAR-НКТ-клеток. НКТ-клетки, обладающие сходными характеристиками с Т-лимфоцитами и НК-клетками, обладают цитотоксичностью, не вызывают побочных реакций при инфузии, кроме того, для терапии на основе CAR-НКТ-клеток не требуется тщательного подбора донора [6].

Тем не менее, несмотря на видимые преимущества и перспективность, CAR-технология на основе НК- и/или НКТ-клеток пока не получила широкого применения. Существенным препятствием являются трудоемкость и значительные финансовые затраты, связанные с получением клеток данных популяций в достаточном для проведения курса иммунотерапии количестве. Кроме того, не существует единого протокола, разработанного с учетом максимальной эффективности генетической модификации и экспансии CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток: так разные исследовательские группы используют уникальные методики без сравнения результатов их применения относительно других разработанных протоколов, что затрудняет сравнение результатов различных исследований между собой. Поэтому для оптимизации процесса производства CAR-НК-клеток крайне необходима разработка протокола для выделения, активации, экспансии и генетической модификации НК- и НКТ-клеток *in vitro*, включающая в себя преимущества ранее созданных методик.

Степень разработанности темы исследования

С целью получения популяции генетически модифицированных НК-клеток, обладающих высокой эффекторной активностью, в отечественной и зарубежной литературе описаны различные подходы к культивированию и генетическим модификациям. Поскольку применение НКТ-клеток в контексте CAR-терапии является на сегодняшний день малоизученным направлением, то для их обогащения используются те же подходы, что и для экспансии НК-клеток. Так в качестве активаторов деления чаще всего используются сорбированные моноклональные антитела (МАТ) к CD3- и CD28-рецептору, которые, связываясь с Т-клеточным рецептором, стимулируют пролиферацию Т-клеток, активация

которых приводит к секреции провоспалительных цитокинов и, как следствие, к стимуляции НК-клеток. Поскольку данный метод активации влияет на популяцию НК-клеток лишь косвенно, то возникает необходимость поиска новых стимуляторов пролиферации с целью более эффективного обогащения популяции НК-клеток. Для поддержания жизнеспособности и дальнейшей пролиферации лимфоцитов используются различные цитокины, например, интерлейкин-2 (ИЛ-2), ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-18, ИЛ-21, их добавляют в питательную среду в комбинации или по отдельности [7]. Для большей пролиферации и поддержания цитотоксической активности ряд исследователей сокультивирует НК-клетки с фидерами, в качестве которых выступают либо другие иммунные клетки, полученные от того же донора или пациента, либо клетки опухолевых линий [8]. Трансдукция НК-клеток химерным антигенным рецептором возможна различными способами, включающими использование лентивирусных векторов, ретровирусных векторов, электропорации или иных методов [9]. Однако при всем разнообразии существующих подходов к обогащению НК-клеток на сегодняшний день не существует стандартизированного протокола для экспансии, а количество исследований, направленных на сравнение различных методов, крайне мало.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является оптимизация метода обогащения популяций НК- и НКТ-клеток и повышение эффективности генетической модификации лимфоцитов химерным рецептором CAR

В рамках исследования ставятся следующие **задачи**:

1. Оценка влияния ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-21 на пролиферацию, выживаемость, экспрессию активационных маркеров НК- и НКТ-клеток при длительном культивировании, а также исследование цитотоксической активности первичной культуры МПК в зависимости от наличия в питательной среде ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-21.

2. Изучение воздействия МАТ к CD3-, CD28-рецепторам, L-фитогемагглютинаина (L-ФГА), конканавалина А (КонА) и комбинации МАТ + фукозилированный хондроитинсульфат (FCS) на экспансию, выживаемость и экспрессию активационных маркеров НК- и НКТ-клеток, а также на пролиферацию и цитотоксическую активность первичной культуры мононуклеаров периферической крови (МПК).

3. Оптимизация методики использования клеточной линии НЕК 293Т в качестве фидерных клеток для стимуляции деления НК- и НКТ-клеток в первичной лимфоцитарной культуре.

4. Повышение эффективности получения и концентрирования лентивирусного вектора для CAR-трансгена.

5. Подбор условий для осуществления эффективной трансдукции первичной культуры МПК *in vitro* с последующей селекцией CAR-клеток.

Научная новизна

В данной работе для повышения эффективности обогащения культивируемых НК-клеток впервые был использован FCS, который, по данным литературы, ранее не применяли при культивировании НК- и НКТ-клеток. Кроме того, был изучен эффект таких классических активаторов деления иммунных клеток, как L-ФГА и КонА, на первичную культуру лимфоцитов в режиме длительного культивирования в течение 21 дня. В данной работе впервые был разработан протокол для экспансии НК-клеток на основе их соинкубации с клетками культуры НЕК 293Т. Также в исследовании впервые освещены достоинства и недостатки различных подходов к созданию CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток в их сравнительной характеристике и разработан единый протокол, объединяющий достоинства разных методик.

Теоретическая и практическая значимость работы

Получение многочисленной популяции НК- и НКТ-клеток, обладающих высокой пролиферативной и цитотоксической активностью, является неотъемлемой частью разработки терапевтического подхода к лечению онкологических заболеваний с применением CAR-модифицированных лимфоцитов. Оптимизация метода культивирования НК- и НКТ-клеток – необходимый этап при разработке CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток.

Полученные данные могут использоваться при проведении последующих доклинических и клинических испытаний, а также могут быть применены для масштабирования производства CAR-препарата, учитывая, что на данный момент в России не зарегистрировано ни одного отечественного препарата на основе CAR-НК- и/или CAR-НКТ-клеток. Применение такого клеточного продукта относится к отрасли персонализированной медицине, что соответствует самым современным тенденциям в лечении пациентов и отражает приоритеты научно-технологического развития Российской Федерации.

Методология и методы исследования

Методология данной работы была выстроена в соответствии с поставленной целью и по результатам обзора научной зарубежной и отечественной литературы. Методы исследования включали сбор биологического материала (цельной крови и лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата) и сопутствующих медицинских данных от здоровых доноров-добровольцев. В работе использовались вирусологические и молекулярно-генетические (трансфекция, трансдукция), иммунологические (проточная цитометрия, цитотоксический тест) и молекулярно-клеточные (выделение клеток из биологического материала, оценка жизнеспособности, подсчет количества клеток, длительное культивирование) методы. Результаты, полученные в ходе исследования, подвергались статистической обработке и визуализации.

Личный вклад автора

Исходя из темы диссертации, автор принимал личное участие при выборе направления исследования, и разработке его дизайна, а также при определении цели и задач исследования. Вся экспериментальная часть исследования (транспортировка биологического материала, выделение моноклеарных клеток человека, культивирование лимфоцитов, трансдукция, трансфекция, цитометрия, цитотоксический тест), а также обработка, визуализация и интерпретация полученных данных выполнена лично диссертантом. Подготовка публикаций научного исследования по проведенной работе, апробация результатов исследования, написание и оформление данной рукописи выполнены автором самостоятельно.

Положения, выносимые на защиту

1. При изучении влияния различных комбинаций цитокинов (ИЛ-2+ИЛ-15, ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21, или только ИЛ-2) на популяции НК- и НКТ-клеток при их длительном культивировании в течение 21-го дня после активации посредством МАТ было установлено, что максимальный прирост общей численности иммунных клеток, наиболее выраженная пролиферация НК- и НКТ-клеток и самая высокая цитотоксичность первичной культуры лимфоцитов человека, наблюдается при добавлении в питательную среду комбинации цитокинов ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21.

2. Среди активаторов пролиферации нецитокинового происхождения (МАТ, L-ФГА, Кона или МАТ+FCS) наиболее предпочтительным способом для экспансии смешанной популяции НК- и НКТ-клеток является применение комбинации МАТ+FCS, поскольку при этом определяется наибольший прирост общего количества иммунных клеток и максимальное абсолютное число CD56+лимфоцитов.

3. При использовании фидерных клеток линии НЕК 293Т для стимуляции пролиферации НК- и НКТ-клеток наиболее выраженная пролиферация НК-клеток наблюдается в результате применения протокола, включающего однократную соинкубацию с клетками НЕК 293Т в начале культивирования.

4. Для повышения эффективности лентивирусной трансдукции лимфоцитов необходимо концентрирование вирусосодержащего материала в присутствии 25%-ного PEG8000 и разделение клеточных популяций перед активацией, а для обогащения популяции CAR-лимфоцитов – проведение селекции.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Положения диссертации соответствуют паспорту научных специальностей: 3.2.7. Иммунология и 1.5.10. Вирусология. Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований пункта 6 «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов» и пункта 7 «Разработка способов воздействия на иммунную систему с помощью фармакологических препаратов и методов иммунобиотерапии. Исследование эффективности и безопасности этих воздействий» паспорта 3.2.7. Иммунология. А также соответствует областям исследований пункта 5 «Проблемы генной инженерии, использования вирусов как векторов для доставки ксеногенного и дополнительного генетического материала в восприимчивую клетку. Вирусы как инструмент генной терапии. Создание химерных вирусных частиц с заданными свойствами» паспорта 1.5.10. Вирусология.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов определяется тщательным подбором лабораторных методов исследования, воспроизводимостью результатов, а также применением статистических подходов обработки полученных данных. Сформулированные выводы и практические рекомендации отражают результаты проделанной работы и согласуются с поставленными целью и задачами исследования.

Материалы работы доложены на конференциях с международным участием: XVII Всероссийская научно-практическая конференция имени А.Ю. Барышникова с международным участием, 2023 г.; Научная конференция молодых ученых с международным участием "New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology", посвященная 300-летию РАН, 2023 г.; Научная конференция молодых ученых с международным участием "New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology", посвященная 300-летию РАН, 2024 г.; 1st International Online Conference on Functional Biomaterials, 2024 г.; Научная конференция молодых ученых с международным участием "New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology", посвященная 80-летию Великой Победы, 2025 г. Апробация материалов диссертации проведена на заседании Отдела иммунологии и аллергологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» 2 сентября 2025 года (протокол № 2).

Внедрение результатов в практику

Основные результаты и выводы работы внедрены в учебный и научный процесс кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А. А. Воробьева Института общественного здоровья имени Ф. Ф. Эрисмана Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первого Московского государственного медицинского

университета имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации при изучении дисциплин микробиологии и иммунологии, читаемых студентам по направлениям подготовки «Лечебное дело», «Стоматология», «Медико-профилактическое дело», «Фармация», «Педиатрия».

Публикации по теме диссертации

По результатам проведенного исследования автором опубликовано 14 работ, в том числе 2 оригинальные и 1 обзорная научные статьи в международных, зарубежных изданиях, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science, а также 4 оригинальные и 1 обзорная научные статьи в изданиях, включенных в Перечень ВАК при Минобрнауки России, и 5 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций. Материалы работы включены в патент №2813531 от 13.02.2024.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 180 страницах печатного текста по общеустановленному плану, включая список литературы и приложения. Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы. Работа проиллюстрирована 16 рисунками, имеет 13 таблиц. Список литературы состоит из 229 источников, из которых 9 отечественных и 220 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Подходы к лечению онкологических заболеваний

Онкологические заболевания представляют собой обширную группу заболеваний, при которых в организме наблюдается образование доброкачественных и злокачественных опухолей. По происхождению выделяют эпителиальные, соединительнотканые, сосудистые или иные варианты опухолей. Различные виды онкологических заболеваний отличаются друг от друга по скорости роста, способности к метастазированию, первичной локализации и способности поддаваться лечению. Рак, злокачественное онкологическое заболевание, представляет собой существенную проблему для общественного здравоохранения во всем мире, а также находится на втором месте в структуре смертности после заболеваний сердечно-сосудистой системы [10].

Традиционные терапевтические подходы, используемые для лечения рака, включают хирургическое вмешательство, химиотерапию, лучевую терапию, таргетную терапию, иммунотерапию и гормональную терапию. На сегодняшний день хирургическое вмешательство остается основным способом лечения, однако данный подход эффективен только на ранних стадиях заболевания, кроме того при резекции опухоли вместе с окружающими ее тканями может наблюдаться частичная утрата функций пораженного органа. Несмотря на то, что химиотерапия и лучевая терапия оказывают цитостатическое и цитотоксическое действие, при использовании данных методов наблюдается развитие тяжелых побочных эффектов и не исключается возможность появления рецидивов. Самыми распространенными общими побочными эффектами являются невропатии, лейкопения, расстройства желудочно-кишечного тракта, кожные проявления, выпадение волос и сонливость [11]. Еще одним недостатком лучевой терапии и химиотерапии является формирование у опухолевых клеток множественной устойчивости к проводимой терапии.

Гормонотерапия основана на использовании лекарств, которые блокируют действие гормонов, снижают их уровень или воздействуют на рецепторы, стимулирующие рост опухоли. Гормонотерапия может применяться для лечения только ограниченной группы онкологических заболеваний – видов рака, имеющих рецепторы к гормонам. Таргетная терапия представляет собой метод терапии, при котором происходит локальное ингибирование роста опухоли без вреда для здоровых, окружающих опухоль тканей [10]. Результаты применения иммунотерапевтического подхода свидетельствуют об эффективности данного метода не только при лечении первичного рака, но и в предотвращении развития отдаленных метастазов и снижении частоты рецидивов [12]. Однако и у данного метода имеются недостатки: например, развитие аутоиммунных нарушений после проводимой терапии или более низкая эффективность лечения против солидных опухолей относительно гематологических новообразований [11].

Кроме традиционных методов терапии в настоящее время активно разрабатываются и иные способы борьбы с раком, которые могут использоваться как самостоятельно, так и в комбинации с вышеизложенными способами лечения. Например, наночастицы увеличивают проницаемость опухолевого микроокружения и способны удерживать в тканях вводимые препараты или иммунные клетки, что хорошо зарекомендовало себя при комбинированных терапевтических подходах [13]. Другими инновационными способами лечения онкологических заболеваний являются генная терапия, терапия стволовыми клетками, применение антиоксидантов и фотодинамическая терапия.

1.2. Концепция иммуноредактирования, иммунотерапия онкологических заболеваний

Имунотерапевтический подход к лечению онкологических заболеваний является способом борьбы с раком, при котором воздействие оказывается, по большей мере, на клетки иммунной системы на системном уровне и в области

опухолевого микроокружения. Таким образом, восстанавливается естественный противоопухолевый иммунитет, и уничтожение опухолевых клеток происходит за счет цитотоксического действия со стороны иммунной системы.

Самой главной задачей онкоиммунологии является обнаружение механизмов, посредством которых иммунная система позволяет раковым клеткам развиваться и прогрессировать, что в конечном итоге приводит к появлению онкологического заболевания. Понимание природы возникновения рака является не только фундаментальным знанием, но и способно послужить началом разработки новых или усовершенствования уже имеющихся иммунотерапевтических подходов к лечению рака.

Многочисленные исследования выявили определенную тактику уклонения опухолевых клеток от иммунного надзора, что легло в основу гипотезы об «иммуноредактировании», предложенной группой Шрейбера [14]. Иммуноредактирование протекает в три фазы. Иммунная система, главным образом, клетки врожденного иммунитета, непрерывно обнаруживают и уничтожают аномальные (стареющие или потенциально мутировавшие) клетки, которые экспрессируют нетипичные антигены, что лежит в основе процесса, известного как иммунологический надзор. Таким образом, гетерогенная популяция опухолевых клеток подвергается естественному отбору, приводящему к выживанию клонов с низким уровнем иммуногенности (это первая фаза иммуноредактирования или фаза элиминации). Посредством этого процесса не только устраняются высокоиммунные трансформированные клетки, но и развиваются опухолевые клетки, способные избегать иммунного надзора путем низкой экспрессии молекул МНС I и II класса и/или костимулирующих молекул, а также отсутствия или низкой экспрессии опухоль-ассоциированных антигенов (ОАА). Это приводит к тому, что цитотоксические Т-лимфоциты не могут эффективно распознавать и элиминировать опухолевые клетки, которые, являясь быстросеменяющимися, продолжают развиваться и приобретать все новые механизмы резистентности и ускользания (фаза равновесия). Важно указать, что экспрессия и последующее распознавание опухоль-ассоциированных молекулярных паттернов

(ОАМП) может приводить к хроническому воспалению, стимулирующему опухолевый рост. Во время фазы ускользания резистентность раковых клеток является максимальной, клетки характеризуются бесконтрольным ростом, прорастают в здоровые ткани и вызывают метастазирование.

Таким образом, иммунная система обладает двойственным эффектом: с одной стороны, она предотвращает развитие злокачественного новообразования, а с другой, способна стимулировать канцерогенез. Считается, что преобладание того или другого процесса зависит от равновесия секретируемых цитокинов, стимулирующих или ингибирующих опухолевый рост. Существует две точки зрения относительно развития опухолевых клеток: одни исследователи считают, что рост опухоли базируется на генетической нестабильности данных клеток, в то время как другие авторы указывают на преобладающее значение опухолевоспецифической толерантности иммунной системы, что позволяет создавать благоприятное для опухолевых клеток микроокружение. Наличие разных точек зрения среди исследователей лишь подчеркивает множественность механизмов взаимодействия между опухолевыми и иммунными клетками.

Следует отметить, что реализация противоопухолевого иммунного цикла является результатом целой системы взаимодействий, в основе которых лежат не только клеточные, но и молекулярно-генетические составляющие. Как и любая биологическая система, противоопухолевый иммунитет подвержен динамической регуляции на всех этапах этого процесса. Недостаточное уничтожение опухолевых клеток приводит к прогрессированию опухоли, а избыточная активация иммунного цикла – к появлению аутореактивных клонов Т-лимфоцитов. Механизмы, направленные против гиперактивации Т-клеток, также могут быть использованы опухолевыми клетками для ускользания против иммунного надзора [14]. Целью современного иммунотерапевтического подхода к лечению опухолевых новообразований является восстановление равновесия противоопухолевого иммунного цикла, что достигается различными способами: ингибированием иммунных контрольных точек, противоопухолевыми вакцинами или с помощью адоптивной терапии.

1.3. Ингибиторы иммунных контрольных точек и противоопухолевые вакцины

Ингибиторы иммунных контрольных точек (ИКТ) представляют собой рецепторы и лиганды, которые поддерживают динамическое равновесие иммунного цикла за счет активации или ингибирования Т-лимфоцитов. В настоящее время наиболее распространены такие ИКТ, как антитела к цитотоксическому Т-лимфоцит-ассоциированному белку 4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4, CTLA-4), рецептор запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1) и его лиганд (PD-1L) [15]. К достоинствам данного метода лечения относится лучшая по сравнению к химиотерапией переносимость пациентов, возможность использования ингибиторов ИКТ при различных солидных и гематологических злокачественных новообразованиях, длительный эффект после проводимой терапии, возможность выздоровления пациента на терминальных стадиях заболевания, а также доступность биомаркеров для прогнозирования эффективности выбранной тактики лечения [16].

CTLA-4 – это мембранный ингибирующий рецептор, находящийся на поверхности Т-хелперов и Т-супрессоров. Связывание данного рецептора с лигандом приводит к снижению активности Т-клеточного звена: происходит ингибирование активации и пролиферации цитотоксических Т-лимфоцитов и, вероятно, активация и экспансия Т-регуляторов (Treg) [16]. Антитела-антагонисты CTLA-4, например, Ипилимумаб (Yervoy®, BristolMyers Squibb Company), приводит к повышению эффекторной функции лимфоцитов, увеличивая долгосрочный прогноз выживаемости пациентов с меланомой [17].

Другими зарегистрированными лекарственными средствами, являющимися ингибиторами иммунных контрольных точек, являются блокаторы PD-1 — Ниволумаб (Opdivo®, Bristol-Myers Squibb) и Пембролизумаб (Keytruda®, Merck & Co.); а также PD-1L-блокаторы — Атезолизумаб (Tecentriq®, F. Hoffmann-La Roche), Авелумаб (Bavencio, EMD Serono, Inc.) и Дурвалумаб (Imfinzi, AstraZeneca UK Limited). PD-1 является рецептором, экспрессированным на поверхности

активированных Т-лимфоцитов и блокирующим активацию сигнального каскада PI3-киназы. В результате ингибирования этого сигнального каскада уменьшается секреция цитокинов, пролиферация и эффекторная функция активированных Т-лимфоцитов. Эффективность использования блокаторов PD-1 обусловлена экспрессией опухолевыми клетками PD-1L, что в модельных исследованиях приводило к блокировке иммунного ответа [18]. Ингибирование нежелательного взаимодействия PD-1 с PD-1L восстанавливает функции Т-лимфоцитов при противоопухолевом ответе. На сегодняшний день в литературе описана клиническая эффективность блокаторов PD-1 и PD-1L при лечении различных видов рака [19].

Сигнальные пути CTLA-4 и PD-1/PD-L1 представлены различными механизмами. Сигнальный путь CTLA-4 воздействует на начальных этапах иммунного ответа в лимфоузлах, в то время как сигнальный путь PD-1 регулирует активность Т-лимфоцитов, локализованных в области опухоли. Поэтому для терапии возможно применение различных комбинаций ингибиторов ИКТ для достижения максимальной эффективности. Поэтому чаще всего одновременно применяют ингибиторы ИКТ разных групп [17].

«Новое поколение» ингибиторов ИКТ разрабатывается с целью повышения эффективности лечения и снижения частоты возникновения побочных реакций от проводимой терапии и направлено на взаимодействие с другими контрольными точками иммунитета. Например, LAG3, являющийся мембранным белком Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, дендритных клеток и НК-клеток, обладает многочисленными биологическими эффектами, активируя экспансию Т-клеточного звена и вызывая секрецию цитокинов, а также предотвращает аутоиммунные нарушения. В условиях опухолевого микроокружения, неотъемлемой частью которого являются Treg, гиперэкспрессия LAG3 приводит к истощению и дисфункции иммунных клеток, что обеспечивает рост опухоли [20]. Поэтому ингибирование LAG3 в области опухоли способно восстановить функционирование Т-лимфоцитов и НК-клеток. На данный момент разрабатываются различные препараты на основе MAT (LAG525, REGN3767,

BI 754111, Теботелимаб, FS118) и фузионных белков (IMP321), которые проходят стадию клинических испытаний [21]. Т-клеточный мембранный белок 3 (TIM-3) представляет собой белок, экспрессирующийся на различных иммунных клетках и отвечающий за иммунологическую толерантность [16]. Гиперэкспрессия этого белка в области опухолевого микроокружения является плохим прогностическим критерием для различных видов рака [16]. Лекарственные средства, действующие в качестве блокаторов TIM-3 (MBG453, Sym023, TSR-022), также изучаются в клинических исследованиях (NCT02608268, NCT03489343, NCT02817633) [22]. Еще один белок, являющийся мишенью для ингибиторов ИКТ, — это В7-Н3 (CD276), который можно обнаружить не только на поверхности Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток или дендритных клеток (ДК), но и на мембране клеток селезенки, печени или сердца [16]. Белок В7-Н4 также можно обнаружить во многих тканях, и, как и В7-Н3, он выступает в качестве иммуносупрессора [16]. Препараты, блокирующие В7-Н3 и В7-Н4, например, MGC018 и FPA150, сейчас активно изучаются, и в литературе описаны лишь предварительные, но обнадеживающие результаты [23, 24]. Другими ИКТ, находящимися на стадии клинических испытаний, являются EOS100850 и AB928 – блокаторы аденозиновых рецепторов A2aR и A2bR на поверхности иммунных клеток, поскольку известно, что повышенный уровень аденозина в области микроокружения опухоли подавляет функцию иммунных клеток [16]. Монализумаб также находится на стадии клинических испытаний (NCT03088059) ввиду его связывания с рецептором NKG2A, который подавляет активность Т-лимфоцитов и НК-клеток [25].

Наряду с ингибиторами ИКТ, которые действуют в области опухолевого микроокружения, существует другой подход к восстановлению противоопухолевого иммунитета: использование препаратов-агонистов отдельных звеньев иммунного цикла. Наиболее изученной молекулой, принимающей участие в стимуляции Т-лимфоцитов, является белок 4-1ВВ (CD137). 4-1ВВ повышает выживаемость, пролиферацию, эффекторные функции и секрецию цитокинов Т-клетками [26]. На данный момент существуют два

поколения препаратов-агонистов 4–1BB. К первому поколению относятся Урелумаб, МАТ на основе иммуноглобулина класса G4 (Ig G4), и Утомилумаб, МАТ на основе Ig G2. Высокая доза урелумаба коррелирует с выраженными побочными эффектами, при снижении дозы наблюдалось ухудшение эффективности. Утомилумаб обладает меньшим риском развития побочных явлений, однако его применение затруднено ввиду ограниченной эффективности препарата [27]. Ко второму поколению относятся препараты на основе МАТ к 4–1BB, участки связывания которых отличаются от таковых у Утомилумаба и Урелумаба, а также МАТ, которые способны одновременно связываться как с 4–1BB, так и с другими молекулами (например, опухолевыми антигенами), что приводит не только к клеточной активации, но и к распознаванию опухолевых клеток [28]. ОХ40 (CD134), костимулирующая молекула из семейства рецепторов фактора некроза опухоли, отвечает за проведение активационного сигнала, усиливающего выживание и дифференцировку Т-лимфоцитов. Агонисты ОХ40 обладают выраженным противоопухолевым эффектом, что было показано в различных доклинических экспериментах [29]. К семейству рецепторов фактора некроза опухоли относится также и другая терапевтическая мишень CD27 – рецептор, активирующий внутриклеточный сигнальный путь NF- κ B, что приводит к пролиферации и возрастанию выживаемости лимфоцитов, и повышению секреции интерферона- γ (ИФН- γ) НК-клетками [30]. Агонисты CD27-рецептора активно исследуются в качестве дополнительного компонента комбинированной терапии опухолей [30].

Использование ингибиторов ИКТ не только дало толчок к активному развитию нового подхода к иммунотерапии, но и выявило определенные недостатки данного метода лечения. Прежде всего, это высокий риск развития устойчивости опухоли к проводимой терапии. Исследователи подразделяют такую резистентность на первичную, при которой лечение не являлось эффективным с самого начала, и приобретенную – в данном случае препараты оказывали положительный эффект, но затем опухолевые клетки становились невосприимчивыми к ИКТ. Еще одним значительным недостатком является

развитие побочных реакций, которые называются иммуноопосредованными нежелательными явлениями. Данные реакции могут быть местными, в области введения препарата, и системными. Они чаще всего возникают в течение первых трех месяцев лечения, но могут возникнуть в любое время терапии или даже через несколько месяцев после прекращения лечения. Побочные эффекты чаще всего наблюдаются в органах, населенных микробиотой – кожа, ЖКТ, легкие, или в тех тканях, где статистически чаще всего регистрируются аутоиммунные нарушения (щитовидная железа, суставы) [31]. Тем не менее, иммуноопосредованные нежелательные явления могут возникать практически в любой системе органов, включая сердце, костный мозг, почки, кости, гипофиз [31]. Например, к наиболее распространенным нежелательным реакциям при приеме ипилимумаба относятся сухость, зуд и появление сыпи на коже, желудочно-кишечные расстройства, нарушение функции печени, легких, а также гипофизит и тиреоидит [31]. К другим недостаткам использования ингибиторов ИКТ относится длительный ответ на проводимую терапию, поскольку данные препараты не направлены на немедленное уничтожение опухолевых клеток.

В настоящее время активно разрабатываются новые лекарственные препараты, мишенью для которых являются не только хорошо изученные молекулы иммунитета, но и рецепторы, которым ранее не уделялось достаточно внимания. Однако результаты проводимых клинических испытаний показывают, что ингибиторы ИКТ чаще всего обладают ограниченной эффективностью при монотерапии, поэтому могут использоваться в качестве дополнительного компонента уже проводимой терапии. Тем не менее, разработка ингибиторов иммунных контрольных точек является перспективным, междисциплинарным и активно развивающимся направлением иммунотерапии онкологических заболеваний, включающим в себя не только поиск новых контрольных точек иммунитета, создания препаратов-активаторов или препаратов-ингибиторов, но и подбора оптимальных условий моно- или комбинированной терапии.

Противоопухолевые вакцины. Вакцины против рака можно разделить на профилактические и терапевтические вакцины. Примером профилактических

вакцин можно считать вакцины против таких онкогенных вирусов, как вирус гепатита В и вирус папилломы человека. После вакцинации у пациентов существенно снижается риск развития инфекции, и, как следствие, гепатоцеллюлярной карциномы и рака шейки матки соответственно [32]. Терапевтические вакцины направлены на стимуляцию иммунной системы против клеток, которые уже прошли опухолевое перерождение. Первая появившаяся терапевтическая вакцина от рака – это вакцина против туберкулеза, которая показала свою эффективность при лечении рака мочевого пузыря [33].

Поскольку ОАА часто принимаются иммунными клетками за «безопасные» аутоантигены, первые аутологичные противораковые вакцины были основаны на создании препарата, состоящего из опухолевых клеток пациента, а также адъюванта или вируса. Целью таких вакцин служила поликлональная селекция лимфоцитов и возникновение затем противоопухолевого иммунного ответа. Использование аутологичных опухолевых клеток, инфицированных вирусом болезни Ньюкасла, показало свою эффективность в доклинических исследованиях терапии меланомы и метастатической лимфомы [34]. Также на модели меланомы изучалась эффективность комбинированной терапии, состоящей из вакцин такого типа и ингибиторов ИКТ [35]. Многие аутологичные вакцины, созданные по такому же принципу, имеют ряд терапевтических ограничений ввиду их небезопасности и трудности в получении опухолевых клеток при определенных типах рака [12]. Усовершенствованным подходом к получению противоопухолевых вакцин является создание рекомбинантных препаратов с использованием технологий секвенирования геномной ДНК опухолевых клеток.

Опухолевые неоантигены, идентифицированные с помощью современных методов секвенирования, способны вызывать противоопухолевый иммунный ответ [36]. Такие неоантигены вызывают активацию и секрецию цитокинов Т-хелперами (Тх) и цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ) [36]. С целью создания эффективной персонализированной противоопухолевой вакцины используется комплексный подход, включающий в себя использование машинных алгоритмов поиска подходящих ОАА, которые будут эффективно

связываться с молекулами МНС пациента. Существуют различные виды противораковых вакцин: вакцины на основе синтетических пептидов, мРНК, вирусных или ДНК-содержащих плазмид, а также дендритно-клеточные вакцины. Исходя из различий в выбранной противоопухолевой вакцине, видах рака, против которого проводится терапия, а также отличий пациентов, составляющих группу испытуемых, крайне сложно сравнивать эффективность вакцин, тестируемых в независимых друг от друга исследованиях. Несмотря на то, что использование разработанных противоопухолевых вакцин показывает обнадеживающие предварительные результаты [37], данный подход имеет свои трудности. Например, большинство препаратов разрабатываются на основе неоантигенов, специфичных для МНС I класса, в то время как прогнозирование неоантигенов, связывающихся с МНС II класса, является трудной задачей, поскольку молекулы МНС II класса имеют открытый антиген-связывающий желоб [38]. Кроме того, создание персонализированной вакцины подразумевает большие финансовые вложения, а также длительное время изготовления препарата. Сейчас разработка и производство таких вакцин занимает около 4 месяцев – такой длительный срок изготовления препарата не подходит для лечения пациентов с быстрорастущими или метастатическими опухолями. Поэтому дальнейшие усилия в данном направлении противоопухолевой терапии должны быть направлены на более детальное изучение механизмов противоопухолевых иммунных реакций, усовершенствование алгоритмов прогнозирования подходящего ОАА, а также сокращение стоимости вакцины и времени ее производства.

1.4. Адоптивная клеточная терапия

Большинство ингибиторов ИКТ и вакцин против рака являются молекулярными агентами, действующие в качестве рецепторов или их лигандов, что активирует или ингибирует специфические сигнальные пути иммунного ответа. Принципиально иным подходом является иммунотерапевтический подход на основе адоптивной клеточной терапии, где в качестве главного

компонента используются живые клетки иммунной системы, активированные различными способами. При данном методе лечения используются либо ТИЛ, либо лимфоциты, подверженные генетическим модификациям.

ТИЛ – это клетки иммунной системы, которые обнаруживаются в опухолевом микроокружении. К ТИЛ относятся такие субпопуляции Т-лимфоцитов, как $TCR\gamma\delta^+$, $TCR\alpha\beta^+ CD4^+ CD8^+$, $TCR\alpha\beta^+ CD4^- CD8^-$, $CD3^+$ Т-клетки памяти, клетки-предшественники Т-лимфоцитов, $TCR\alpha\beta^+ CD3^+ CD8^+$ ЦТЛ, $TCR\alpha\beta^+ CD3^+ CD4^+$ Тх, Тreg [39]. К В-клеточному звену относятся антиген-презентирующие В-клетки, плазматические клетки, регуляторные В-лимфоциты [39]. Из клеток врожденного иммунитета в опухоли можно обнаружить НК-клетки и хелпер-подобные лимфоидные клетки [39]. ТИЛ используются не только в качестве основы адоптивной клеточной терапии, но и как маркеры, учитываемые врачами-онкологами при назначении ингибиторов ИКТ и при прогнозировании течения заболевания.

Идея применения терапии с использованием ТИЛ заключается в восстановлении у них эффективного противоопухолевого иммунного ответа, который в организме человека активно подавляется опухолевым микроокружением. Активное изучение и использование ТИЛ в терапевтических целях началось в 1980-х гг. после экспериментального лечения метастатической меланомы: лимфоциты, окружающие раковые клетки, были выделены после биопсии опухоли, стимулированы с помощью ИЛ-2, а затем повторно внутривенно введены тому же самому пациенту в комбинации с большой дозой ИЛ-2 [40]. Использование инновационного подхода в борьбе с раком показало эффективность в 34% случаев, а медиана продолжительности иммунного ответа составила всего 4 месяца [41]. Дальнейшие клинические исследования, включавшие этап лимфодеплеции, были более успешными, с полной регрессией опухоли у 20 (22%) пациентов, 19 из которых через 3 года после лечения все еще находились в состоянии полной ремиссии [42]. К недостаткам данного метода относится отсутствие эффекторных Т-клеток в области опухолевого микроокружения при многих типах рака, что существенно снижает

эффективность терапии [43]. Другими проблемами использования ТПЛ является необходимость сложно переносимой для пациента процедуры кондиционирования, высокая стоимость проводимой процедуры, а также доказанная эффективность только в отношении меланомы [44].

CAR-лимфоциты. Основой распознавания ТПЛ является презентация антигенов в комплексе с МНС, в то время как экспрессированные на поверхности клетки опухолевые антигены не способны активировать лимфоциты [45]. Наличие у опухолевых клеток антигенов, которые не распознаются Т-лимфоцитами в качестве чужеродных, привело к созданию адаптивной клеточной терапии на CAR-лимфоцитов. Главным отличием CAR-лимфоцитов от ТПЛ является возможность распознавания опухолевых антигенов напрямую при межклеточном взаимодействии.

Химерный рецептор антигена – это синтетический иммунный рецептор, имеющий уникальную структуру и состоящий из внеклеточного домена распознавания антигена (это, как правило, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) МАТ) и внутриклеточного сигнального домена Т-лимфоцитов. Ограничением для разработки CAR-терапии является необходимость наличия определенного целевого антигена на поверхности клеток опухолевой ткани, который не экспрессируется на здоровых клетках. Например, первое клиническое применение CAR-Т-клеток на основе молекулы CD19, которая экспрессируется на всех В-клетках, показало высокую эффективность при лечении хронического лимфоцитарного лейкоза [46]. Также CAR-Т-клетки на основе CD19 с успехом использовались для лечения пациентов с острым лимфобластным лейкозом В-клеток и пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой [47]. Результаты данных исследований привели к одобрению Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США первого препарата для CAR-терапии – Тисагенлеклейсела (Kymriah®). В настоящее время проводится разработка препаратов на основе создания рецептора к другим антигенам как гематологических, так и солидных опухолей [48]. Помимо прямого цитолитического действия CAR-Т-клетки могут

преодолевать неблагоприятную среду опухолевого микроокружения и стимулировать истощенные Т-лимфоциты этой области [49]. Так, например, CAR-T-клетки нового поколения, способные секретировать ИЛ-12, способны преодолевать иммуносупрессивное воздействие Treg и миелоидных клеток в области опухолевого микроокружения, стимулировать эффекторные функции ЦТЛ и усиливать презентацию антигена [50]. Сейчас проводятся клинические исследования препарата такого типа (MUC16(ecto)) на эффективность лечения пациентов с раком яичников, фаллопиевых труб или первичным раком брюшины [50]. Другим подходом к усилению ответа на проводимую CAR-терапию является дополнительная экспрессия химерного рецептора к ИЛ-4 – цитокину, который часто присутствует в области опухолевого микроокружения в высокой концентрации [51]. Кроме того, было показано, что повышенная экспрессия фактора транскрипции JUN придает CAR-T-клеткам устойчивость к истощению [52].

В целом, препараты на основе CAR-T-лимфоцитов оказались успешными в лечении злокачественных новообразований В-клеток, на данный момент для применения одобрено шесть препаратов на основе CAR-T-лимфоцитов: тисагенлеклейсел (Kymriah®), аксикабтаген цилолейсел (Yescarta®), брексукабтаген аутолейсел (Tecartus®), Лизокабтаген маралейсел (Breyanzi®), идекабтаген виклейсел (ABECMA®) и цилтакабтаген аутолейсел (CARVYKT1®). Также проводится большое количество доклинических и клинических испытаний препаратов на основе других модифицированных иммунных клеток. Тем не менее, на данный момент не существует ни одного зарегистрированного российского препарата на основе CAR-клеток. Поэтому разработка отечественного биомедицинского клеточного продукта (БМКП) с использованием результатов общедоступных клинических и доклинических испытаний и знаний зарубежных коллег является крайне важным и перспективным направлением для отечественной системы здравоохранения.

Как и любой существующий на данный момент метод лечения онкологических заболеваний CAR-технология имеет свои недостатки.

После проведенного лечения у пациентов могут наблюдаться токсические реакции с различной степенью тяжести [53]. Чаще всего пациенты сталкиваются с синдромом высвобождения цитокинов (СВЦ) и нейротоксичностью [54]. СВЦ возникает в результате сильной активации и последующей пролиферации CAR-T-клеток *in vivo* и обычно проявляется в первые дни после клеточной инфузии. Симптомы при СВЦ варьируют от проявлений легкой степени тяжести до таких тяжелых и жизнеугрожающих состояний, как лихорадка, низкое артериальное давление, нерегулярное сердцебиение, снижение функции сердца и легких, отеки и накопление жидкости, снижение уровня кислорода, а также нарушение функции почек, печени или свертываемости крови [54]. Механизм формирования неврологических нарушений после CAR-T-терапии до конца не изучен. Тем не менее, у пациентов могут наблюдаться головная боль, тремор, нарушение речи (например, экспрессивная афазия), делирий, спутанность сознания, нарушение сознания (ступор, летаргия, притупление сознания) или, в самых тяжелых случаях, может развиваться отек мозга или судороги [54]. Другими недостатками данного подхода является дороговизна создания CAR-T-клеток и отсутствие утвержденных протоколов создания данного БМКП.

1.5. Строение CAR-рецептора

Прежде всего, необходимо детально рассмотреть строение вектора, содержащего CAR-трансген. CAR состоит из трех частей: эктодомена, трансмембранной области и эндодомена. Кроме генов, кодирующих синтез CAR, вектор содержит все элементы, которые необходимы для экспрессии этого рецептора – промотор, полиадениновый сигнальный участок и фрагменты регуляции транскрипции. Поскольку промоторы инициируют транскрипцию CAR, степень экспрессии трансгена напрямую зависит от выбора определенного промотора. Сообщается, что размер промотора влияет на эффективность вирусной трансдукции: чем короче промотор, тем более эффективно экспрессируется зеленый флуоресцентный белок (GFP) [55]. На данный момент

проводятся различные исследования, направленные на сравнение эффективности различных промоторов, поэтому представляется сложным выделить какой-либо промотор в качестве наиболее перспективного для использования. Самыми распространенными промоторами являются EF1 α , CMV, MSCV, hPGK и RPBSA [56]. Интересной стратегией, направленной на увеличение экспрессии CAR, является интеграция CAR-гена в локус константной α -цепи Т-клеточного рецептора (TRAC). Трансдуцированные CAR-лимфоциты с интеграцией CAR-гена в локус TRAC (TRAC-CAR-лимфоциты), обладают более стойкой CAR-экспрессией с высокой опухоль-инфильтрирующей способностью [57]. После стимуляции целевым антигеном у таких клеток повышается экспрессия CAR, в то время как у лимфоцитов, содержащих экзогенный промотор, наблюдается снижение экспрессии химерного рецептора.

На эффективность встраивания CAR в мембрану клетки влияет также выбор сигнального пептида, который участвует в посттрансляционной сборке белка. Несмотря на большую гетерогенность сигнальных пептидов чаще всего используется сигнальный пептид рецептора CD8a или сигнальный пептид иммуноглобулина тяжелой или легкой цепи [58].

Эктодомен CAR представлен одноцепочечным фрагментом МАТ - scFv, содержащим линкер между тяжелой и легкой цепью и шарнирной областью, которая соединяет эту структуру с трансмембранным фрагментом и служит местом прикрепления эктодомена к клеточной мембране. ScFv, является доменом связывания опухолевого антигена и определяет специфичность CAR-клеток [59]. На данный момент для CAR-терапии используются ОАА, которые не являются исключительно опухолевыми, но обычно такие антигены на опухолевых клетках гиперэкспрессированы. Разнообразие scFv, способных связывать один и тот же антиген, не только влияет на развитие полноценного иммунного ответа, но и в ситуации случайного взаимодействия с нормальными клетками может приводить к развитию побочных реакций. Следовательно, подбор scFv должен проводиться с учетом максимально специфичного связывания только с ОАА. Тем не менее, многочисленные усилия, предпринятые для поиска подходящей мишени

на солидных опухолях, показывают, насколько сложным может быть процесс выбора scFv ввиду невысокой экспрессии ОАА на поверхности здоровых тканей [60]. Важность тщательной разработки дизайна scFv также объясняется в исследовании, где показано, как специфичные к одному и тому же антигену различные scFv могут давать очень разную экспрессию CAR [61]. Другие исследователи демонстрируют, что из восьми CAR-конструкций, отличающихся только scFv, эффективно экспрессировались и проявляли цитотоксичность только две из них [62]. Выбор scFv может повлиять и на снижение выраженности реакции «хозяин против трансплантата» (РХПТ), а, значит, повысить персистенцию CAR-лимфоцитов в организме пациента. Большинство используемых scFv получены из мышиных антител, поэтому проблему отторжения CAR-лимфоцитов можно решить путем гуманизации мышиных scFv или путем получения scFv из полностью человеческих антител.

Линкер между тяжелой и легкой цепью влияет на конформацию scFv и, следовательно, частично определяет, насколько хорошо рецептор будет распознавать целевой эпитоп. С одной стороны, слишком короткие линкеры предотвращают ассоциацию доменов scFv, а с другой стороны, слишком длинные линкеры могут вызывать протеолиз или слабую ассоциацию между scFv-доменами [63]. Для CAR-НК-клеток наиболее широко используются мультимеры пентапептида GGGGS (глицин-серин), часто в виде пятнадцатимера [61]. Другим линкером, предназначенным для повышения протеолитической стабильности, является линкер Витлоу «218» (Whitlow «218»): GSTGSGSKPGSGEGSTKG; он способен усиливать сродство доменов scFv [64]. В настоящее время существует недостаточно данных, чтобы сделать выводы о лучшем линкере для CAR-конструкции.

Шарнирная область, также называемая спейсером, представляет собой внеклеточную структурную область CAR, которая соединяет единицы scFv с трансмембранным доменом. Эти спейсеры обычно поддерживают стабильность, необходимую для надежной экспрессии CAR и проявления цитотоксичности. Шарнирная область также обеспечивает гибкость эктодомена с целью облегчения

доступа к целевому антигену. Большинство CAR-конструкций используют производные внеклеточных доменов CD8 α или CD28 или шарниры на основе IgG. При прямом сравнении шарнирных доменов CD28 и CD8 α было обнаружено, что шарнирные домены CD28 с большей вероятностью способствуют димеризации молекул CAR, поэтому активационный стимул в данном случае оказывается сильнее [65]. Тем не менее, результаты другого исследования показали, что использование шарнирного домена CD8 α способствует повышению безопасности анти-CD19-CAR-T-терапии [66].

Трансмембранный домен соединяет эктодомен CAR с внутриклеточными активационными сигнальными доменами. Наиболее часто используемыми трансмембранными доменами для создания CAR-НК-клеток являются трансмембранные домены из CD3 ζ , CD8 и CD28, и домены из NKG2D, 2B4, DNAM1, которые используются реже. Было показано, что выбор трансмембранного домена влияет на функциональность конструкции CAR, а, значит, и на степень активации клетки и ее последующую активность [67]. Например, рецептор NKG2D является мощным активатором НК-клеток и, таким образом, представляет собой подходящую основу для дизайна CAR-НК-конструкции. Использование трансмембранной области рецептора NKG2D в ориентации от N-конца к C-концу в сочетании с 2B4 и DAP10 существенно повышает цитотоксичность CAR-НК-клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) [67]. Тем не менее, на данный момент чаще всего используются трансмембранные домены, полученные из CD8 α и CD28 [58].

1.6. Различные поколения CAR

Повышение эффективности CAR-терапии возможно путем совершенствования CAR-рецептора. На данный момент известно несколько поколений CAR-рецепторов. CAR-рецептор первого поколения был разработан в 1987 г. [68] и представлял собой продукт слияния константной области

Т-клеточного рецептора (TCR) с вариабельными областями антигенраспознающего антитела. Однако, клетки, оснащенные таким типом рецептора, не оказывали выраженного противоопухолевого эффекта.

Затем, исходя из понимания того, что для полноценной передачи сигнала эндогенный участок TCR должен взаимодействовать с другими костимулирующими или вспомогательными молекулами, начали разрабатывать рецепторы второго и третьего поколения, которые включали один или два костимулирующих домена соответственно. Чаще всего в качестве костимулирующих доменов использовали фрагменты CD28 или 4-1BB, что обеспечивало более выраженную противоопухолевую активность, повышенную секрецию цитокинов и улучшенную пролиферацию CAR-T-клеток [69]. Выбор костимулирующего домена влияет на широкий спектр свойств модифицированных клеток, включая активацию и поддержание различных метаболических путей и развитие Т-клеток памяти [70], что вызывает интерес к поиску новых вспомогательных активирующих молекул. Например, CAR третьего поколения с костимулирующими доменами OX40 и CD28 подавляют секрецию противовоспалительного ИЛ-10, который снижает активность Т-клеток [71]. Кроме того, костимулирующий домен индуцируемого Т-клеточного костимулятора в сочетании с костимуляцией CD28 или 4-1BB увеличивает персистенцию *in vivo*, а костимуляция MyD88/CD40 улучшает пролиферацию CAR-T-клеток *in vivo* [72].

Генетическая последовательность CAR четвертого поколения дополнительно содержит гены, кодирующие синтез различных цитокинов [73]. Провоспалительный ИЛ-12, секретируемый CAR-лимфоцитами четвертого поколения, стимулирует противоопухолевый иммунный ответ клеток врожденного иммунитета и повышает сопротивляемость к ингибирующему воздействию опухолевого микроокружения [74]. Изучается возможность использования других хемокинов и/или интерлейкинов: ИЛ-15, ИЛ-18, а также комбинации CCL19 и ИЛ-7 [75, 76, 77].

В литературе также описываются современные подходы к оптимизации, повышению эффективности и снижению токсичности CAR-терапии на уровне создания химерного рецептора антигена. Оптимизация, описанная в одной из работ [78], направлена на CAR «традиционного» строения, который состоит из внеклеточного антигенраспознающего участка, трансмембранного домена и внутриклеточного сигнального домена. Однако существуют и принципиально иные дизайны CAR-конструкций, направленные на улучшение распознавания и уничтожения опухолевых клеток.

Синтетический рецептор семейства Notch (synNotch), который запускает индуцибельную экспрессию гена-мишени при распознавании лиганда на поверхности клетки, был разработан для обнаружения ОАА и индукции экспрессии CAR, который впоследствии, после распознавания второго ОАА, может запустить активацию Т-клеток [79]. Было показано, что такой подход снижает вероятность случайного уничтожения неопухолевых клеток, поскольку для запуска цитотоксической реакции необходима связь сразу с двумя опухолевыми антигенами [80]. Поскольку существует задержка между распознаванием первого ОАА посредством synNotch и второго ОАА посредством CAR, то существует вероятность, что клетка после активации первым ОАА и экспрессии CAR впоследствии сможет атаковать здоровую клетку, несущую второй ОАА. В целях предотвращения подобного исхода был разработан метод, при котором на поверхности клетки будут экспрессироваться два CAR, распознающих разные антигены, а активации клетки будет происходить только при наличии обоих антигенов [81]. Кроме того, возможно создание ингибирующего CAR, лигандом для которого служит антиген здоровой ткани. В данном случае ингибирующий CAR связан с активирующим CAR, который нацелен на ОАА. Таким образом происходит ингибирование CAR-Т-клеток в области здоровых тканей [82].

В то время как описанные выше методики направлены на повышение распознавания опухолевых клеток, существуют и способы их более эффективного уничтожения путем обхода ускользания антигена или потери целевого эпитопа

опухолевыми клетками. Например, CAR-конструкция, способная распознавать два антигена, вызывает активацию клетки в результате связывания любого из двух ОАА. Другая стратегия включает терапию с использованием смеси двух популяций CAR-T-клеток, каждая из которых экспрессирует моноспецифический CAR [83]. Вариацией данного подхода является последовательное введение пациенту двух БМКП, отличающихся по специфичности распознавания CAR. Следуя такому же принципу, возможно создание CAR-лимфоцитов, коэкспрессирующих два отдельных CAR в одной клетке или экспрессирующих тандемный биспецифический CAR, который включает два домена scFv, разделенных линкером на одной рецепторной цепи. Подход с использованием тандемного биспецифического CAR показал высокую эффективность на модели лабораторных животных [84] и при лечении пациентов со злокачественными образованиями В-клеток [85, 86]. Терапевтические подходы включающие биспецифические CAR, состоящие из комбинации CD19/CD20 или CD19/CD22, на данный момент находятся на стадии клинических испытаний и используются при лечении лимфом и острого лимфолейкоза соответственно (NCT04007029, NCT04215016, NCT03919526, NCT04303520).

Другие исследователи фокусируются на способах контроля активности CAR-T-клеток после их инфузии в целях снижения или предотвращения СВЦ и нейротоксичности без уменьшения противоопухолевой активности лимфоцитов. Это возможно либо путем регулировки экспрессии CAR, либо путем изменения конформации CAR. Например, CAR могут быть связаны с молекулами, которые инактивируются при связи с низкомолекулярными веществами [87], либо в условиях локальной гипоксии [88]. Такие CAR не проявляют активности в связанном состоянии и становятся активными только при изменении условий.

В качестве альтернативы CAR может быть сконструирован таким образом, что для активации и проведения сигнала в клетку данный рецептор должен связаться с дополнительным белком или белковым комплексом. CAR, включающий домен связывания биотина, будет активироваться

при взаимодействии с любой клеткой-мишенью, которая помечена биотинилированным антителом. Такая конструкция имеет название «универсального» CAR, поскольку клетка с таким рецептором способна взаимодействовать практически с любой опухолевой клеткой через специфичное антитело. Также в качестве универсального CAR может использоваться конструкция, антиген-связывающий участок которой представлен CD16-рецептором (аллотип V158). Такой модифицированный рецептор активируется посредством присоединения МАБ, специфичных к антигенам опухолевых клеток, что вызывает антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ). Одним из преимуществ данной CAR-конструкции является возможность контроля над активностью CAR-клеток посредством дозирования вводимого препарата МАБ. Использование универсального CAR в сочетании с несколькими антиген-связывающими адаптерными белками представляет собой возможность преодоления гетерогенности опухоли и снижения частоты побочных реакций у пациентов [89]. Тем не менее, ввиду увеличения числа анализируемых параметров, разработка универсальных CAR-лимфоцитов требует дополнительных этапов исследования, а именно изучение периода полураспада и биораспределения адаптерных белков, а также динамику взаимодействия адаптера с рецептором с последующей внутриклеточной передачей сигнала.

1.7. Методы генетической модификации лимфоцитов

В рамках разработки CAR-препарата существенное внимание отводится эффективности внедрения CAR на поверхность иммунных клеток, что достигается различными способами. Существует две группы методов генетической модификации лимфоцитов: методы с применением вирусных и невирусных векторов. В качестве вирусного вектора чаще всего используют лентивирус, γ -ретровирус и рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) [90]. Более 90% находящихся на стадии клинических испытаний

препаратов CAR-T-лимфоцитов создаются с использованием вирусного вектора, причем чаще всего предпочтение отдается лентивирусам, ввиду эффективного встраивания генетической информации лентивирусных и γ -ретровирусных векторов в геном клетки с последующей стойкой экспрессией CAR-конструкции [91]. Несмотря на распространенное применение лентивирусных и ретровирусных векторов такой подход имеет определенные недостатки. Прежде всего, лентивирусный вектор, несущий CAR-ген, встраивается в геном T-клетки случайным образом, что в дальнейшем может привести к генетическим мутациям и подавлению или гиперэкспрессии случайных генов, что тем самым снижает безопасность проводимой терапии [92]. Более того, лентивирусные векторы имеют ограниченную транскрипционную способность, что снижает экспрессию всей сложной CAR-конструкции, включая не только целевую последовательность, но и регуляторные элементы [93]. гAAV, в свою очередь, представляет собой непатогенный парвовирус, в котором упакован одноцепочечный ДНК-геном [94]. Парвовирус имеет множество серотипов, которые обладают разной эффективностью при трансдукции различных тканей и клеток [94]. Также гAAV может существовать в форме эписомы, что обеспечивает долгосрочную экспрессию генов [95]. гAAV являются более безопасными вирусными векторами по сравнению с лентивирусами и γ -ретровирусами, поскольку с меньшей частотой встраиваются в геном клетки [96]. Препараты на основе аденоассоциированного вектора с успехом применяются для лечения дефицита липопротеинлипазы, врожденного амавроза Лебера и спинальной мышечной атрофии [97]. Однако использование гAAV при разработке CAR-лимфоцитов имеет существенные ограничения из-за низкой эффективности трансдукции, проводимой на гемопоэтических стволовых клетках и первичных T-клетках [98]. Важно учитывать, что использование вирусных векторов при крупномасштабном производстве CAR-лимфоцитов для последующего клинического применения требует соблюдения правил и стандартов надлежащей производственной практики (GMP), что повышает стоимость БМКП и затрудняет производственный процесс.

К другой группе протоколов для генетической модификации лимфоцитов относятся, так называемые, невирусные методы, к которым относятся ДНК-транспозоны, система коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR/Cas9), и мРНК. Также есть различные способы доставки такого генетического материала в клетку, осуществляемые путем электропорации, липофекции, использования липидных наночастиц (LNP). Невирусные векторы являются более безопасными для целостности клеточного генома, их проще и дешевле изготавливать [99].

Система транспозона состоит из двух основных компонентов: фермента транспозазы и самого транспозона. Транспозон состоит из интересующего гена, например, CAR-конструкции, и определенных последовательностей, необходимых для транспозазы, которая распознает и вырезает целевой ген из транспозона, а затем интегрирует его в геном клетки-хозяина [100]. На данный момент проводятся различные исследования, изучающие эффективность использования систем транспозонов для создания CAR-клеток [101].

Система CRISPR/Cas9 активно исследуется не только в качестве инструмента для лечения генных заболеваний, но и для генной модификации лимфоцитов. Так с помощью данного подхода удалось создать анти-CD19 CAR-T-лимфоциты, которые затем показали себя в качестве эффективного и безопасного метода лечения пациентов с В-клеточной неходжкинской лимфомой [102]. Несмотря на перспективность использования CRISPR/Cas9 в различных отраслях медицины, безопасность данного терапевтического подхода остается предметом исследований. Прежде всего, следует обратить внимание на появление случайных мутаций в нецелевых участках клеточного генома, поскольку геном содержит множество участков ДНК, которые идентичны и в высокой степени гомологичны целевой последовательности ДНК [103].

Наименее изученным носителем CAR-конструкции является мРНК. Использование технологии мРНК для создания CAR-продукта является многообещающим подходом в иммунотерапии, поскольку позволяет обойти риск инсерционного мутагенеза и облегчает производственный процесс [104].

Результаты доклинических исследований анти-TNFRSF17 CAR-T-клеток, созданных с помощью мРНК, показали 7-дневную экспрессию CAR-конструкции и снижение таких побочных реакций, как неограниченная пролиферация лимфоцитов и выброс большого числа провоспалительных цитокинов при контакте с клетками-мишенями [105].

Помимо носителей CAR-конструкции в невирусных векторах активно разрабатываются способы доставки вектора внутрь клетки. Электропорация, наиболее часто используемый метод, основана на применении электрических импульсов, которые индуцируют небольшие временные поры в клеточной мембране, что позволяет проникать генетическому материалу в клетку [106]. Процедуру электропорации можно проводить на большинстве типов клеток с дальнейшим формированием временных генетических модификаций. К другим достоинствам метода относится возможность сочетания электропорации с разноразмерными генетическими конструкциями [107]. Тем не менее, после проводимой электропорации часто наблюдается апоптоз клеток, а также отсутствие передачи генетической информации дочерним клеткам после деления электропорированной клетки [108]. Несмотря на наличие исследований, направленных на изучение CAR-лимфоцитов, подвергнутых процедуре электропорации [107], дальнейшие эксперименты в данном подходе будут направлены на пролонгирование экспрессии CAR.

LNP состоят из монослоя фосфолипидов и холестерина, внутрь которого инкапсулируют мРНК [109]. LNP защищают нуклеиновую кислоту от внеклеточной деградации и позволяют мРНК проникнуть внутрь клетки после эндоцитоза LNP [109]. Липофекция включает инкапсуляцию нуклеиновых кислот в катионные липосомы [110]. В большинстве исследований проведение трансфекции путем липофекции не приводит к эффективной экспрессии CAR, а также является токсичной для клеток процедурой из-за используемых заряженных липидов [110]. Липидные наночастицы обладают более выраженной эффективностью, однако являются дорогостоящим инструментом

для генетических манипуляций и требуют дополнительных исследований, направленных на усовершенствование методики [111].

1.8. Виды CAR-терапии

На сегодняшний день наиболее распространенной популяцией лимфоцитов, на основе которой создаются CAR-клетки, являются Т-лимфоциты – популяция лимфоцитов, которая обладает способностью к клональной экспансии и которую легко получить от донора в большом количестве. Тем не менее, использование Т-клеток приводит к появлению проблем, опосредованных использованием данной популяции, и побуждает исследователей искать альтернативные источники иммунных клеток. Трудности при CAR-T-терапии начинаются на этапе получения Т-лимфоцитов от пациента или его ближайших родственников. В случае аутологичного источника, при котором лимфоциты получают от самого пациента, выделяемые Т-лимфоциты могут обладать сниженной цитотоксической активностью и сниженной способностью к пролиферации и секреции цитокинов ввиду системного супрессивного воздействия опухолевой ткани или в результате проводимой химиотерапии или лучевой терапии [112]. Аллогенные источники Т-лимфоцитов требуют подбора донора и реципиента на совместимость по МНС, что замедляет процесс производства CAR-T-лимфоцитов, особенно в случаях отсутствия у пациента близких родственников. Следующая проблема заключается в длительности производства. Процесс создания БМКП, включающий активацию Т-клеток, вирусную трансдукцию и не менее шести дней экспансии *ex vivo*, занимает в среднем две недели [113]. В случае быстро прогрессирующих опухолей двухнедельное ожидание терапии может существенно усугубить состояние здоровья пациента [114]. Кроме того, изготовление персонализированного БМКП не только представляет собой длительный и трудоемкий процесс, но и является дорогостоящим методом лечения, при котором производство CAR-T-клеток проводится централизованно на базе крупнейших онкологических центров. Финансовые затраты и невозможность получения

иммунотерапии в отдаленных регионах страны снижает доступность терапии для населения. Поэтому в целях внедрения CAR-технологии в повсеместную медицинскую практику необходимо разрабатывать протоколы, направленные на снижение времени и стоимости изготовления CAR-лимфоцитов.

Перспективным представляется процесс, при котором CAR-клетки, полученные из аллогенных источников, изготавливаются в штатном режиме, не «по запросу», а конечным этапом производства является криоконсервация готовых БМКП, которые впоследствии могут быть быстро доставлены в самые отдаленные медицинские центры. Для достижения данной цели возможны две стратегии: изменение источника иммунных клеток для генетических манипуляций или дополнительная модификация Т-лимфоцитов. Например, результаты исследований показывают, что в условиях несоответствия МНС наивные клетки чаще вызывают РТПХ относительно Т-клеток памяти [115]. Следовательно, Т-клетки памяти, которые к тому же обладают высокой цитотоксичностью, могут быть использованы в целях снижения риска развития РТПХ при аллогенном источнике клеток. Другими способами модификации Т-лимфоцитов является нокаут гена TCR [116] или внедрение гена CAR в локус TRAC [57]. Аллогенные CAR-Т-клетки с разрушенным Т-клеточным рецептором оказались эффективны в двух клинических испытаниях при лечении рецидивирующего В-клеточного лейкоза с результатом в 67% для полной ремиссии и 27% для шестимесячной выживаемости без прогрессирования [117]. Также возможно проведение трансдукции Т-клеток, целью которой является экспрессия не только CAR, но и аллоиммунного защитного рецептора, лигандом которого является 4-1BB [117]. Такой аллоиммунный защитный рецептор продлевает персистенцию аллогенных лимфоцитов после инфузии, поскольку часто аллогенные клетки подвергаются отторжению со стороны иммунной системы реципиента [118].

Несмотря на наличие путей преодоления проблем аллогенных источников для CAR-Т-терапии, некоторые трудности, связанные Т-клеточным БМКП, все еще остаются нерешенными. К ним относится высокий риск развития побочных реакций [54], невысокая эффективность при лечении солидных опухолей, а также

уклонение опухоли от иммунного ответа посредством потери антигена в случае применения CAR, нацеленного на один опухоль-специфический антиген [119]. Поэтому многие исследователи проявляют большой интерес к изучению альтернативных источников иммунных клеток для создания CAR-препаратов. Использование клеток, которые лучше проникают в глубину опухоли естественным образом, устраняют опухолевые клетки с помощью других сигнальных путей, формируют и поддерживают противоопухолевую микросреду, а также вызывают минимальные побочные эффекты, поможет преодолеть некоторые трудности применения CAR-T-клеток. Использование других типов клеток также может снизить огромную стоимость производства. Альтернативными источниками иммунных клеток для CAR-терапии являются Treg, $\gamma\delta$ T-клетки, ассоциированные со слизистой оболочкой инвариантные T-клетки (MAIT), НКТ-клетки, НК-клетки, макрофаги, нейтрофилы, гемопоэтические стволовые/прогениторные клетки (ГСК/ГПК) и ИПСК.

Treg. Treg играют ведущую роль в поддержании гомеостаза и предотвращении аутоиммунных реакций. Эти клетки подавляют иммунитет посредством прямого межклеточного контакта или при помощи секреции противовоспалительных цитокинов, например, IL-10, IL-35 и TGF- β . Также Treg способны косвенно блокировать активацию T-лимфоцитов, подавляя созревание антигенпрезентирующих клеток (АПК) и экспрессию костимулирующих молекул на их поверхности [120]. Ввиду специфического воздействия Treg на иммунную систему CAR-Treg могут быть использованы для лечения многих аутоиммунных заболеваний [120]. Уникальные свойства Treg рассматриваются и в качестве источника клеток для CAR-иммунотерапии опухолевых заболеваний. Во время I и II фазы клинических испытаний (NCT05114837) оценивались безопасность, переносимость пациентом и потенциальная противоопухолевая эффективность аллогенного анти-CD19 CAR-Treg при лечении пациентов с рецидивирующим/рефрактерным острым лимфоцитарным лейкозом [121]. Тем не менее, терапия опухолевых заболеваний на основе CAR-Treg является малоизученным и дорогостоящим подходом.

γδТ-лимфоциты. $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, являющиеся связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом, обладают мощным противоопухолевым ответом. Их способность к быстрой клональной экспансии в ответ на инфекцию, воспаление и опухоль, что, вероятно, происходит из-за распознавания нативных антигенов без участия молекул МНС, позволяет $\gamma\delta$ Т-клеткам функционировать в качестве первой линии защиты организма наряду с макрофагами и нейтрофилами. Однако $\gamma\delta$ Т-клетки можно отнести и к приобретенному иммунитету, ведь у них наблюдается наличие разнообразных вариантов Т-клеточного рецептора, способность к продукции таких же цитокинов, что и $\alpha\beta$ Т-клетки, развитие цитотоксического ответа и формирование клеток с фенотипом клеток памяти [122]. Для уничтожения опухолевых клеток $\gamma\delta$ -Т-лимфоциты секретируют перфторин и гранзимы или экспрессируют TRAIL и FasL, а также влияют на НК-клетки [122]. Использование $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов имеет некоторые преимущества относительно терапии на основе $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов. Прежде всего, это неклассическое распознавание широкого спектра стрессорных и опухолевых клеток независимо от МНС [123], что предотвращает развитие РТПХ в случае выбора аллогенного источника клеток. Другими достоинствами данного метода являются высокая противоопухолевая активность $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, стимуляция ими других иммунных клеток и инфильтрация $\gamma\delta$ Т-клетками опухолевой ткани, что коррелирует с благоприятным прогнозом выздоровления [124]. Результаты I фазы клинического испытания (NCT00562666), где аутологичные $\gamma\delta$ Т-клетки использовались для лечения пациентов с метастатической почечно-клеточной карциномой, показали безопасность и эффективность $\gamma\delta$ Т-клеток [125]. Результаты других клинических испытаний также продемонстрировали противоопухолевую активность CAR- $\gamma\delta$ Т-клеток при терапии гематологических и солидных опухолей, как *in vitro*, так и *in vivo* [126]. Важно упомянуть, что в одном клиническом исследовании (NCT02656147) в отличие от анти-CD19 CAR- $\alpha\beta$ Т-клеток, анти-CD19 CAR- $\gamma\delta$ Т-клетки были активны не только против CD19-положительных, но и против CD19-отрицательных опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* [127]. Авторы данной работы предполагают, что такое явление

связанно со способностью CAR- $\gamma\delta$ T-клеток распознавать опухолевые клетки через $\gamma\delta$ TCR даже после потери опухолевого антигена. Несмотря на обнадеживающие результаты, терапевтический потенциал и возможные недостатки CAR- $\gamma\delta$ T-клеток на данный момент остаются малоизученными.

MAIT. MAIT является уникальной, эволюционно консервативной субпопуляцией T-клеток, которая обнаруживается в печени и на слизистых оболочках [128]. MAIT экспрессируют полуинвариантный $\alpha\beta$ TCR, который распознает непептидные антигены в комплексе с молекулой MR1, относящейся к MHC I класса [128]. Клетки MAIT могут быть активированы TCR-зависимым и независимым образом, они проявляют мощную цитотоксическую активность посредством секреции перфорины, гранзима В, экспрессии TRAIL и FasL и выделения провоспалительных цитокинов с целью активации других клеток иммунной системы [128]. Инвариантные T-клетки обладают некоторыми важными для CAR-терапии свойствами. Их легко получить от пациента в большом количестве, поскольку данная субпопуляция составляет до 10% циркулирующих T-лимфоцитов, а в тканях печени количество MAIT достигает 45% [129]. Имея фенотип эффекторных клеток памяти, MAIT способны вызывать иммунный ответ в кратчайшие сроки [130]. Так как MAIT экспрессируют маркеры тканевого хоуминга, например, CCR5, CCR6, CCR9 и CXCR6, то они способны мигрировать в периферические ткани, особенно в ткани, имеющие слизистую оболочку, что, вероятно, будет весьма полезно при терапии онкологических заболеваний в данных тканях. Более того, поскольку MAIT не ограничены только классической активацией через MHC, они, скорее всего, не будут вызывать РТПХ при выборе аллогенного источника лимфоцитов. Несмотря на наличие доклинических исследований, результаты которых демонстрируют безопасность и высокую цитотоксичность анти-CD19 CAR-MAIT [129], пока не было зарегистрированных клинических испытаний, которые необходимы для формирования полноценной картины достоинств и недостатков CAR-технологии на основе ассоциированных со слизистой оболочкой инвариантных T-клеток.

Макрофаги и нейтрофилы. Использование макрофагов и нейтрофилов для CAR-терапии представляется еще одной привлекательной идеей, поскольку эти клетки способны презентировать антигены, секретировать цитокины и осуществлять такие реакции клеточной гибели, как фагоцитоз, нетоз или трогоцитоз. Анти-HER2 CAR-макрофаги оказывали антигенспецифический фагоцитоз раковых клеток и привлекали другие иммунные клетки в область опухолевого микроокружения при изучении их на модели ксенотрансплантатов [131]. На базе данного исследования разработчики приступили к первой фазе клинических испытаний (NCT04660929) для того, чтобы оценить безопасность, эффективность, переносимость и миграцию CAR-макрофагов при лечении пациентов с неметастатическими или метастатическими солидными опухолями [132]. Клинических испытаний, проверяющих активность и безопасность CAR-специфичных нейтрофилов, пока зарегистрировано не было. Хотя модифицированные макрофаги и нейтрофилы имеют большой потенциал при лечении рака, для достижения желаемых результатов необходимо преодолеть множество проблем. Отличие внутриклеточных сигнальных путей и цитотоксических реакций макрофагов относительно лимфоцитов требует более детальной разработки CAR для данной популяции [133]. Перенос генов в первичные макрофаги человека крайне затруднителен, поскольку макрофаги и моноциты обладают внутренней устойчивостью к генетическим манипуляциям [131] и не подвержены клональной экспансии, что существенно ограничивает процесс генерации CAR-макрофагов. Следующей проблемой является возможность реполяризации провоспалительных CAR-M1-макрофагов в M2-популяцию, которая будет способствовать росту опухоли и метастазированию [134]. Говоря о нейтрофилах, следует упомянуть об их устойчивости к генетическим модификациям и короткой продолжительности жизни с 6-8-часовым периодом полураспада в кровотоке [135]. Поэтому для разработки CAR-нейтрофилов необходимо использовать индуцированные плюрипотентные стволовые клетки или гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки, модифицировать их, а затем направлять на дифференцировку в нейтрофилы [136].

ГСК/ГПК и ИПСК. ГСК/ГПК конститутивно поступают из костного мозга в кровь и способствуют процессам локального кроветворения клеток врожденного иммунитета. CAR-модификация человеческих ГСК/ГПК обеспечивает долгосрочное наличие антигенспецифических клеток множественных гемопоэтических линий [137]. Поскольку ИПСК можно размножать без ограничений и дифференцировать практически в любой специализированный тип клеток, они могут быть отличной альтернативой для тех клеточных популяций, которые не подвержены клональной экспансии и устойчивы к генетическим манипуляциям (макрофаги и нейтрофилы) [136]. Несмотря на большое разнообразие CAR-клеток, полученных из ГСК/ГПК при различных условиях культивирования и имеющих разный CAR-рецептор, и успешные доклинические эксперименты [138], клинические испытания CAR-лимфоцитов, полученных из ГСК/ГПК, еще не проводились. ИПСК используются для создания, в первую очередь, неограниченного запаса Т-клеток для последующей модификации CAR [139], поскольку такой подход позволяет сформировать долгосрочную иммунологическую память и избежать истощения клеток, что часто наблюдается при использовании первичных Т-лимфоцитов [140]. БМКП на основе CAR-Т-клеток, полученных из ИПСК, в настоящее время является первой в истории полученным из ИПСК Т-клеточным препаратом, который прошел стадию клинических испытаний (NCT04629729). Однако, чаще всего, ИПСК становятся источником клеток для генерации НК-клеток, что будет рассмотрено в следующем разделе. Недостатки использования ГСК/ГПК и ИПСК заключаются в необходимости тщательной оценки их безопасности и опухолевой трансформации после дифференцировки *in vitro*. Кроме того, методы выделения, генетической модификации и дифференцировки требуют оптимизации и сокращения времени производства и производственных затрат [141].

1.9. CAR-НК- и CAR-НКТ-терапия

В то время как CAR-терапия на основе Treg, $\gamma\delta$ T-клеток, MAIT, макрофагов, нейтрофилов или стволовых клеток является перспективным, но малоисследованным подходом к иммунотерапии, достаточно хорошо изученной альтернативой CAR-T-терапии является лечение пациентов с помощью генно-модифицированных НК-клеток, а также клеток, которым присущи признаки, как натуральных киллеров, так и T-лимфоцитов, – НКТ-клеток.

НКТ-клетки. НКТ-клетки – клетки врожденного иммунитета, имеющие $\alpha\beta$ T-клеточный рецептор и схожие по морфологии и эффекторным функциям с НК-клетками. Являясь эволюционно консервативными иммунными клетками, НКТ-клетки распознают липидные и гликолипидные антигены, презентруемые при помощи CD1d [142]. Как и $\gamma\delta$ T-лимфоциты, НКТ-клетки, по-видимому, всегда находятся в активированном состоянии, обеспечивая быстрый и эффективный иммунный ответ, опосредованный перфорином/гранзимом или экспрессией индуцирующих апоптоз лигандов [142]. Еще одной важной функцией НКТ-клеток является секреция широкого спектра цитокинов и хемокинов, с помощью которых они могут влиять на иммунный ответ. Использованию НКТ-клеток для CAR-терапии способствуют следующие свойства: мощная противоопухолевая активность посредством прямой цитотоксичности или активации $\alpha\beta$ T-клеток, снижение ингибирующей активности опухоль-ассоциированных макрофагов и миелоидных супрессорных клеток, а также отсутствие риска развития РТПХ ввиду возможности активации через рецепторы НК-клеток [143]. Тем не менее, согласно данным литературы, главная функция НКТ-клеток в контексте проводимой CAR-терапии – это борьба с иммуносупрессивным опухолевым микроокружением [144].

На модели ксенотрансплантатов НКТ-клетки, экспрессирующие анти-GD2 CAR и секретирующие ИЛ-15, показали хорошие результаты – улучшенную инфильтрацию опухоли и повышенную противоопухолевую активность [145]. Далее данная CAR-конструкция применялась при CAR-НКТ-терапии пациентов

с рецидивирующей/резистентной нейробластомой (NCT03294954). Первоначальные результаты этого клинического испытания, проводимые у десяти пациентов, показывали безопасность метода, а также благоприятные исходы с полным выздоровлением у одного пациента, частичным выздоровлением у трех пациентов и остановкой прогрессирования роста опухоли у трех пациентов. В другом исследовании использовали анти-CD19 CAR-НКТ-клетки, экспрессирующие CD62L, которые показывали длительную персистенцию и выживаемость модифицированных НКТ-клеток в области опухоли и вызывали устойчивую опухолевую регрессию [146]. Дальнейшее изучение CAR-НКТ-клеток продемонстрировало более высокую эффективность анти-CD19 CAR-НКТ-клеток относительно анти-CD19 CAR-T-лимфоцитов при лечении экспрессирующих CD1d клеток лимфом вследствие двойного распознавания НКТ-клетками CD1d и CD19 на поверхности опухолевых клеток [147]. Также были разработаны CAR-НКТ-лимфоциты, обладающие специфичным распознаванием хондроитинсульфатпротеогликана-4, CD38 и специфического для плазматических клеток антигена созревания В-клеток ВСМА, причем такие модифицированные лимфоциты обладали как CAR-специфической, так и TCR-зависимой цитотоксичностью против клеток меланомы [148]. В настоящее время проводятся четыре клинических испытания, в которых изучается безопасность и эффективность анти-CD19 CAR-НКТ-клеток для лечения рецидивирующих и рефрактерных В-клеточных злокачественных новообразований [149]. Несмотря на многообещающие результаты исследований возможностей CAR-НКТ-клеток в доклинических и клинических исследованиях, существует несколько трудностей при разработке технологии подобного рода. Например, низкая частота НКТ-клеток в периферической крови человека требует использования протоколов для экспансии НКТ-клеток *in vitro*.

НК-клетки. НК-клетки — это крупные гранулярные лимфоциты, которые преимущественно циркулируют в крови, составляя 5–10% лимфоцитов периферической крови человека [150]. НК-клетки являются первой линией защиты организма от опухолевых или пораженных вирусами клеток. В отличие от

Т- и НКТ-клеток у натуральных киллеров отсутствует экспрессия CD3 и TCR, их идентифицируют, как CD56⁺CD16⁺клетки. В зависимости от степени экспрессии CD56 НК-клетки принято разделять на две субпопуляции: CD56^{dim}, преобладающие в кровотоке зрелые клетки с высокой цитотоксичностью, и CD56^{bright}, находящиеся преимущественно в лимфоидных органах лимфоциты с повышенной секрецией цитокинов [151]. Уникальность и главное отличие НК-клеток от Т-лимфоцитов заключается в распознавании антигенов, которое опосредуется коллективным сигналом от активирующих и ингибирующих поверхностных рецепторов [151]. Ключевыми рецепторами, участвующих в распознавании и уничтожении клеток-мишеней, являются группа рецепторов естественной (NKp44, NKp30, NKp46) цитотоксичности и NKG2D-рецептор. Противоопухолевая активность осуществляется с помощью секреторного лизиса (перфорин/гранзимовый механизм), несекреторного лизиса (экспрессия FasL и TRAIL) и АЗКЦ [151].

Как основной тип эффекторных клеток врожденного иммунитета, НК-клетки обладают рядом преимуществ по сравнению с Т-клетками. Они быстрее реагируют на опухолевые клетки, поскольку способны воздействовать на клетки-мишени без предварительной сенсibilизации. Как упоминалось ранее, цитотоксичность НК-клеток может реализовываться различными механизмами. Снижение экспрессии МНС-I на опухолевых клетках, используемое ими как механизм ускользания от CAR-T-клеточного иммунного ответа, ведет к усилению распознавания НК-клетками, которые уничтожают все клетки, не экспрессирующие МНС I класса [3]. НК-клетки также могут секретировать множество цитокинов для активации других иммунных клеток, а генетические манипуляции с НК-клетками улучшают не только их способность к распознаванию опухолевых клеток, но и цитотоксичность и жизнеспособность в опухолевом микроокружении [9]. Использование НК-клеток не требует тщательного подбора донора по системе МНС. Результаты исследований, в которых проводился адоптивный перенос аллогенных НК-клеток, демонстрируют безопасность, хорошую переносимость и незначительное наличие

побочных эффектов [4]. Результаты других исследований показывают, что на мышинной модели трансплантации МНС-несовместимых гемопоэтических стволовых клеток НК-клетки донора не только не вызывают РТПХ, но даже защищаются от РХПТ путем разрушения антигенпрезентирующих клеток реципиента. Соответственно, это воздействие может снижать иммунное отторжение аллогенных НК-клеток [152]. Далее более подробно будут рассмотрены этапы получения CAR-НК-клеток *in vitro*, а также результаты клинических испытаний CAR-НК-терапии.

1.10. Источники получения НК-клеток

Источниками НК-клеток могут быть мононуклеарные клетки периферической крови (МПК), пуповинная кровь, эмбриональные стволовые клетки (ЭС-клетки), ИПСК и линии НК-клеток [150]. Чаще всего для создания CAR-НК-клеток используется периферическая кровь [153]. Выделенные из периферической крови НК-клетки обладают зрелым фенотипом и высокой цитотоксичностью, но ограничены в пролиферативной способности и их количество в крови варьирует от 5 до 10% общего числа лимфоцитов [153]. Получить МПК в большом количестве можно с помощью процедуры афереза. Аферез проводится после осуществления процедуры обогащения циркулирующих клеток-предшественников и стволовых клеток (оценку проводят по количеству CD34+ циркулирующих клеток) [153]. CD34+ в данном случае могут выступать в роли предшественников НК-клеток.

Выделение стволовых клеток из костного мозга на сегодняшний день проводится только в единичных случаях ввиду трудностей при заборе материала и транспортировке по сравнению с процедурой афереза, поэтому НК-клетки из костного мозга не получают. Еще одним источником стволовых клеток для их дальнейшей дифференцировки в НК-клетки или источником незрелых НК-клеток является пуповинная кровь. Использование пуповинной крови – это интересный источник иммунных клеток для лечения онкологических заболеваний:

пуповинную кровь можно использовать при неполном соответствии донор-реципиент, подбирая таким образом «донора» даже для тех пациентов, у которых не было МНС-совместимых родственных или неродственных доноров [154]. По официальным данным в государственных банках пуповинной крови по всему миру хранится более 600 000 единиц пуповинной крови, однако, фактически эта цифра гораздо выше, если принимать во внимание количество частных организаций. Большой запас пуповинной крови является уникальным источником иммунных клеток с целью проведения крупномасштабного производственного процесса CAR-НК-клеток. В ряде исследований сообщается о получении значительного количества функционально активных НК-клеток даже из небольшого образца пуповинной крови [155], что может служить основой для производства аллогенных CAR НК-лимфоцитов.

Получение НК-клеток из ЭС-клеток и ИПСК в настоящее время является трудоёмким процессом, поскольку необходимо учитывать такие параметры, как тип донорских соматических клеток-мишеней, способ доставки факторов транскрипции в эти клетки, а также методика генетических модификаций [156]. Кроме того, НК-клетки, полученные из ЭС-клеток и ИПСК, наряду с другими иммунными клетками, полученными сходным образом, являются, возможно, не самой безопасной популяцией [157].

В целом, количество клинических испытаний CAR-НК-клеток за последние годы существенно возросло, при этом изучаются воздействие на различные мишени, как гематологических (CD5, CD7, CD19, CD22, CD33, CLL1, BCMA, CD70, CD123), так и солидных (NKG2DL, HER2, MUC1, PSMA, Мезотелин, ROBO1, DLL3, CLDN6, 5T4, PD-L1) злокачественных новообразований. Результаты данных исследований показывают эффективность, безопасность и отсутствие тяжелых побочных явлений [158].

Использование первичных культур НК-клеток требует наличия таких этапов, как их изоляция, очистка, экспансия *ex vivo* и трансдукция, что является трудоёмким и затратным процессом. Тем более что для CAR-НК-терапии требуется многократное введение пациенту CAR-НК-клеток, поскольку они

сохраняют жизнеспособность после адоптивного переноса в течение короткого промежутка времени. В целях снижения себестоимости БМКП источником НК-клеток могут выступать клеточные линии. Наиболее изученной и подходящей для данных целей является клеточная линия NK-92 (NantKWest Inc., Калвер-Сити, Калифорния, США), которая обладает фенотипом активированных НК-клеток, высокой цитотоксичностью и бесконечной пролиферативной способностью [159]. Культура NK-92 легче подвержена генетическим модификациям, а также представляет собой гомогенную популяцию без присутствия Т-лимфоцитов, которые при введении пациенту могли бы вызвать РТПХ.

Различные доклинические испытания подтвердили перспективность использования NK-92 для CAR-терапии гематологических злокачественных новообразований (лимфома, острый миелоидный лейкоз, множественная миелома, Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз, периферические Т-клеточные лимфомы) и солидных опухолей (рак молочной железы, рак предстательной железы, нейробластома, глиобластома, рак желудка) [160]. Результаты клинических исследований также показывают безопасность и мощную противоопухолевую активность клеток CAR-NK-92 [149]. Однако NK-92 не могут быть идеальным источником клеток для CAR-NK-терапии, поскольку перед инфузией требуется обязательная процедура облучения клеток в целях избегания риска вторичной туморогенности. Кроме того, в геном этой клеточной линии интегрирован ген вируса Эпштейна-Барр, что требует дополнительных мер безопасности при работе с данной культурой. Также отсутствие экспрессии CD16-рецептора на поверхности клеток NK-92 либо ограничивает их эффекторную функцию, реализуемую по принципу АЗКЦ, либо требует дополнительной генетической модификации для экспрессии CD16-рецептора [161].

1.11. Получение CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток *in vitro*

Получение CAR-НК-клеток в лабораторных условиях подразумевает генетические манипуляции для внедрения CAR, а также создание оптимальных условий для экспансии и усиления цитотоксичности. Следует отметить, что ввиду недостаточного количества исследований, посвящённых генетическим модификациям НК-клеток, для них используются те же подходы к генной инженерии, что и для Т-лимфоцитов [162]. Кроме того, подходы к экспансии и модификации НКТ-клеток практически не отличаются от таковых для НК- и Т-клеток из-за текущей нехватки исследований в данном направлении [6].

Согласно литературным данным вне зависимости от источника получения НК-клеток в качестве основного домена активации (CAR) почти повсеместно используется CD3 ζ в комбинации с дополнительными доменами 4-1BB или CD28. Если говорить про конструкции третьего поколения, то чаще всего используется комбинация CD28/4-1BB/CD3 ζ [163].

Далее необходимо осветить способы доставки CAR-вектора в НК-клетки. Чаще всего исследователи прибегают к вирусной трансдукции, эффективность которой существенно варьирует у разных исследователей. Lentivirальные векторы являются наиболее часто используемыми векторами для трансдукции НК-клеток, поскольку ретровирусы не обладают доказанной безопасностью, а использование мРНК-технологии в совокупности с электропорацией приводит лишь к кратковременной экспрессии химерного рецептора [58]. Lentivirальные векторы третьего поколения считаются более безопасными относительно векторов второго поколения, поскольку кодируют вирусные гены gag/pol и rev, которые расположены на отдельных плаزمиде, что препятствует сборке рекомбинантного вируса дикого типа [164]. Чтобы улучшить долю клеток, экспрессирующих CAR, после трансдукции можно проводить селекцию с помощью антибиотиков, ген устойчивости к которым должен быть включен в состав вектора.

Несмотря на преимущества выбора вирусной трансдукции эффективность внедрения CAR-рецептора с помощью лентивирусов в первичные НК-клетки остается большой проблемой. Поэтому были разработаны определенные стратегии, направленные на усиление эффективности трансдукции НК-клеток. Для облегчения трансдукции первичных клеток часто используется псевдотипирование – встраивание в оболочку вируса белков, облегчающих проникновение в иммунные клетки. Для псевдотипирования применяют гликопротеин вируса везикулярного стоматита (VSV-G) или эндогенный вирус бабуина (BaEV) [165]. Основными клеточными рецепторами для связывания VSV-G являются рецептор липопротеинов низкой плотности (ЛПНП-рецептор) и фосфатидилсерин [166]. Рецепторами для BaEV являются ASCT1 и ASCT2, которые значительно экспрессируются на активированных НК-клетках [167]. Другим подходом является использование таких катионных полимеров, как протамин сульфат [168], полибрен [169] и декстран [170], с целью уменьшения отрицательных зарядов на клеточной мембране и оболочке вируса. Также известны и другие соединения для усиления эффективности трансдукции: Форбол-12-миристан-13-ацетат (PMA) [171], рапамицин [172], циклоспорин А [173], вектофузин-1 [174] и ретронектин [175].

Помимо внедрения CAR, культивирование НК-клеток нацелено на их активацию, экспансию и увеличение цитотоксичности. Экспансия НК-клеток *ex vivo* является важной задачей при создании CAR-НК-клеток, поскольку для иммунотерапии требуется введение большого количества модифицированных лимфоцитов. Вне зависимости от источника НК-клеток в организме человека невозможно сразу получить чистую популяцию натуральных киллеров, поскольку они не существуют изолированно. Поэтому для обогащения НК-клеток и получения гомогенной культуры, состоящей преимущественно из НК-клеток, используются методы магнитной сепарации или сортировки клеток. Сепарация НК-клеток проводится до начала культивирования или является его конечным этапом [154]. Более предпочтительной является сепарация на финальном этапе культивирования вследствие потенциально положительного воздействия других

популяций лимфоцитов на НК-клетки при сокультивировании, однако, нельзя исключать и взаимное ингибирование между популяциями. Целенаправленное культивирование НК-клеток в присутствии других иммунных клеток, которые в данном случае имеют название аутологичных фидерных клеток, является одним из подходов к стимуляции пролиферации НК-клеток и поддержании их функциональной активности. Например, CD14+моноциты усиливают пролиферацию НК-клеток *ex vivo* за счет прямого клеточного контакта и секреции растворимых факторов [176]. Использование аутологичных фидерных клеток является хорошо изученной, безопасной и максимально приближенной к *in vivo* условиям технологией. Тем не менее, культивирование НК-клеток в таких условиях приводит к совместной экспансии нежелательной популяции Т-клеток, составляющих в конечном клеточном продукте большую часть клеток. Методы разделения клеточных популяций тоже имеют свои недостатки: проведение сепарации снижает жизнеспособность иммунных клеток, а также увеличивает стоимость препарата за счет использования дополнительных дорогостоящих реагентов.

Длительность культивирования НК-клеток зависит от конкретной методики и колеблется от 7 до 21 дня. Вне зависимости от наличия или отсутствия разделения популяций в начале культивирования иммунные клетки проходят этап активации. Активаторы – это вещества, чаще белковой природы, способные связываться с рецепторами иммунных клеток, стимулировать их и вызывать пролиферацию и экспрессию активационных маркеров. Этап активации важен и для последующей трансдукции, поскольку процесс клеточного деления облегчает проникновение лентивируса. Во многих протоколах для *in vitro* экспансии Т-клеток используются моноклональные антитела к CD3-/CD28-рецептору [177]. При сокультивировании НК-клеток с аутологичными фидерными клетками комбинация ОКТ3 и ИЛ-2 приводит к секреции цитокинов, которые влияют на экспансию НК-клеток [178]. Активация Т-клеток КонА также оказывает влияние на пролиферацию НК-клеток [179]. Культивирование в присутствии МІСА, родственного МНС I класса белка, который является лигандом для

NKG2D-рецептора, а также в присутствии ИЛ-15 и s4-1BBL приводит к экспансии НК-клеток и повышению у них противоопухолевой активности [180]. Кроме того, для активации НК-клеток используют липополисахарид [181], L-ФГА [182] и иономицин [183].

Перспективными для изучения гемостимулирующими веществами являются такие сульфатированные полисахариды, как фукоиданы и хондроитинсульфат, а также фукозилированный хондроитинсульфат (FCS), выделенный из морского огурца *Cucumaria japonica* [184]. Этот класс полисахаридов стимулирует деление всех кроветворных клеток, увеличивая количество лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов в экспериментальных исследованиях, но, в отличие от колониестимулирующих факторов, обладает низкой токсичностью [185]. Кроме того, данные полисахариды способны снижать концентрацию ИЛ-6, который принимает участие в развитии СВЦ [186].

Самым простым и изученным методом активации и экспансии НК-клеток является добавление в питательную среду интерлейкинов. Чаще всего используется ИЛ-2, который вызывает повышенную секрецию цитокинов, усиливает внутриклеточную передачу сигналов STAT3/AKT и активирует группу различных рецепторов естественной токсичности и NKG2D-рецептор [187]. ИЛ-2 индуцирует повышение экспрессии ЛПНП-рецептора в НК-клетках, что приводит к усилению трансдукции, пролиферации и цитотоксичности [187]. ИЛ-2-активированные НК-клетки проявляют гораздо более высокую цитотоксическую активность в отношении культуры-мишени K562 и более высокую жизнеспособность после криоконсервации по сравнению с нестимулированными НК-клетками [187]. Безопасность ИЛ-2 для экспансии НК-клеток была доказана в различных клинических исследованиях [187]. Также исследователи обращают внимание на роль ИЛ-15, которые способствует выживаемости НК-клеток [188]. ИЛ-15 повышает противоопухолевую активность НК-клеток посредством передачи сигналов через мишень рапамицина у млекопитающих (TOR) и посредством стресс-индуцированной экспрессии генов [188]. Тем не менее, концентрация и кратность добавления ИЛ-15 должна быть

тщательно подобрана, так как ИЛ-15-опосредованная передача сигналов может вызывать функциональное истощение НК-клеток за счет снижения окисления жирных кислот, что приводит к снижению цитотоксичности как *in vitro*, так и *in vivo* [189]. Еще одним цитокином, используемым для экспансии НК-клеток, является ИЛ-21, который участвует в дифференцировке НК-клеток из ГСК/ГПК и усиливает цитотоксичность и секрецию цитокинов [190]. По результатам клинического исследования, НК-клетки, культивируемые с ИЛ-21 и ИЛ-15 без фидерных клеток, однако обладали высокой цитотоксической активностью в отношении первичных лейкозов, их введение хорошо переносилось пациентами и коррелировало со снижением прогрессирования лейкемии [191]. ИЛ-12 является стимулятором НК-клеток, вызывая пролиферацию, повышенную цитотоксичность и секрецию IFN- γ НК-клетками [192]. ИЛ-12-опосредованная секреция НК-клетками IFN- γ происходит при праймировании с ИЛ-18, который, как известно, усиливает ИЛ-15-индуцированную пролиферацию НК-клеток [193]. Так как интерлейкины обладают синергизмом, то для *ex vivo* стимуляции НК-клеток можно использовать комбинацию из цитокинов. Комбинирование ИЛ-12, ИЛ-15 и ИЛ-18 вызывает особый интерес, так как это приводит к появлению т. н. «цитокин-индуцированных НК-клеток памяти» (CIML), которые проявляют повышенную способность продуцировать IFN- γ при повторной стимуляции [194]. Адоптивный перенос CIML НК-клеток обладает существенной противоопухолевой активностью *in vivo* против меланомы или лимфомы [194]. Также комбинация ИЛ-12, ИЛ-15 и ИЛ-18 приводит к повышению чувствительности CIML НК-клеток к низкой концентрации ИЛ-2 *in vitro* и *in vivo* [194].

Иным методом стимуляции НК-клеток является использование фидерных клеток. В то время как при избыточном добавлении интерлейкинов в питательную среду может наблюдаться цитокин-индуцированное истощение иммунных клеток [58], наличие фидерных клеток обеспечивает их межклеточное взаимодействие с НК-клетками, что приводит к появлению дополнительных стимулирующих сигналов. Помимо рассмотренных выше аутологичных фидерных клеток,

в качестве фидеров используются также различные клеточные линии. Для снижения нежелательного размножения МПК-фидеров необходимо использование облучения. Данный процесс также вызывает активацию на МПК стресс-регулируемых поверхностных молекул, например, ULBP1-3, что является дополнительным стимулом для НК-клеток [195]. Как показывают исследования, количество отдельных KIR+ НК-клеток может увеличиваться в 160-390 раз за 19 дней при культивировании с ИЛ-2, ИЛ-15, ОКТ-3 и облученными аутологичными МПК [196]. Аллогенные фидерные клетки из МПК будут крайне полезны для разработки CAR-НК-продукта для лечения пациентов с ослабленным иммунитетом или транзиторным иммунодефицитом вследствие системного действия опухоли или проводимой онкотерапии [197].

Среди клеточных линий наиболее успешными для активации НК-клеток являются: В-клеточная лимфобластома, трансформированная вирусом Эпштейна-Барр (EBV-TM-LCL), хроническая миелогенная лейкемия (K562) с различными генетическими модификациями, промоноцитная лейкемия (U937), Т-лимфобластная лейкемия (CEM), а также Т-лимфобластная лейкемия (Jurkat) [8]. Наиболее изученной и охарактеризованной клеточной линией является культура K562. Для усиления стимуляции НК-клеток используют линию K562, модифицированную таким образом, что клетки экспрессируют ИЛ-21 и 4-1BBL [8]. Немодифицированная культура K562 вызывает 2,5-кратный недельный прирост НК-клеток, в то время как количество НК-клеток при стимуляции культурой K562, экспрессирующей мембраносвязанный ИЛ-15 и 41BBL (K562-mb15-41BBL), возрастает в 20 раз [8]. Культивируемые в присутствии K562-mb15-41BBL НК-клетки приобретают повышенную цитотоксическую активность как *in vitro*, так и *in vivo* [8]. Встраивание в мембрану клеток K562 ИЛ-21 вместо ИЛ-15 является еще более эффективным методом экспансии НК-клеток, а еженедельная рестимуляция клеточной линией K562, экспрессирующей мембраносвязанный ИЛ-21 и 41BBL, обеспечивает устойчивую пролиферацию НК-клеток в течение нескольких недель [8].

Другой перспективной фидерной линией является культура SMI-LCL – облученный вариант линии EBV-LCL. При стимуляции культурой SMI-LCL, культивировании в присутствии ИЛ-2 и добавлении ИЛ-21 только в начале культивирования наблюдается 10^{11} -кратное увеличение количества НК-клеток [198]. Полученные таким образом НК-клетки обладают высокой цитотоксичностью *in vitro* и повышенной секрецией IFN- γ и TNF- α , и эффективно воздействуют на меланому на модели мышинового ксенотрансплантата [198].

Исходя из результатов исследований, наглядно демонстрирующих преимущество генетически модифицированных клеточных линий при стимуляции деления НК-клеток, представляется любопытным использование в качестве фидерных клеток тех культур, которые легко подвержены генетическим модификациям. Например, это может быть леточная линия почек эмбриона человека, содержащая Т-антиген SV40 (НЕК 293Т). Она является одной из самых часто используемых клеточных культур в лабораторной практике. Благодаря белку SV40 клетки НЕК 293Т обладают способностью реплицировать векторы, несущие область репликации SV40, что находит широкое применение для производства ретровирусов, экспрессии генов и производства белков [199].

К достоинствам использования фидерных клеток относится простота внедрения генетических модификации и культивирования. Тем не менее, при использовании фидерных клеток, особенно перевиваемых культур клеток, требуется регулярная оценка отсутствия вирусной, бактериальной и микоплазменной контаминации, а также проверка конечного продукта на отсутствие содержания в нем остаточных фидерных клеток.

Поэтому в целях повышения безопасности и снижения трудоемкости альтернативой фидерным клеткам могут служить клеточные лизаты, содержащие стимулирующие НК-клетки факторы. Было показано, что кратковременное культивирование НК-клеток с лизатом клеточной линии CTV-1 вызывает лизис клеток, устойчивых к неактивированным НК-клеткам [200]. Причем, стимулирующий эффект CTV-1 на НК-клетки не зависит от KIR и не требует

добавления ИЛ-2 или ИЛ-15, что делает данный протокол для активации НК-клеток уникальным [200].

Вместо использования фидерных клеток или их лизатов также представляется возможным добавление в супернатант только определенных белков фидерных клеток, которые оказывают необходимое воздействие на НК-клетки. Например, НК-клетки можно размножить *ex vivo* с помощью добавления ИЛ-2 и частей плазматической мембраны, приготовленных из культуры K562-mb15-41BBL. При этом скорость размножения сравнима со скоростью деления НК-клеток, которые стимулировались интактными фидерными клетками, и намного превышает скорость размножения при использовании растворимых ИЛ-15, 41BBL и ИЛ-2 [201].

1.12. Получение БМКП на основе CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток, перспективы и текущие ограничения технологии

Так как создание CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток – это биотехнологический производственный процесс, потенциально направленный на массовую терапию онкобольных пациентов, то необходима не только разработка методов эффективной трансдукции и экспансии клеток, но и масштабирование данной технологии. В первую очередь, оценке подлежит большое количество существующих на сегодняшний день лабораторных протоколов для экспансии и трансдукции НК- и НКТ-клеток, эффективность которых, по данным литературы, не сравнивалась между собой. В рамках данной задачи важен подбор критериев оценки эффективности и безопасности различных подходов для их сопоставления и улучшения. Так, например, необходимы дальнейшие модификации CAR, направленные на усиление внутриклеточного сигнала, распознавание нескольких ОАА, внедрение дополнительного тормозного или активирующего рецептора, а также объединение CAR с ингибиторами ИКТ для преодоления негативных эффектов опухолевого микроокружения [202].

В среднем для однократного введения CAR-НК-клеток в терапевтических целях требуется примерно $5-50 \cdot 10^6$ клеток/кг массы тела пациента [203]. Исходя из процентного содержания НК-клеток в исходных материалах, необходимо проводить массивную экспансию *in vitro* данных клеток, используя самые эффективные методики и реагенты, многие из которых, возможно на данный момент изучены плохо или, в данном контексте, не изучены вовсе. При проведении селекции и при культивировании без фидерных клеток прирост количества НК-клеток является небольшим [204]. Поэтому используемые методики по культивированию НК-клеток должны включать фидерные клетки, особенно аутологичные облученные МПК, так как это является самым безопасным вариантом. Используемый протокол создания БМКП на основе CAR-НК-клеток должен также включать дополнительную информацию, например, о старении модифицируемых клеток, определяемое с помощью сравнения длины теломер, а также об отсутствии микробной обсемененности и контаминации токсичными веществами [153].

Для снижения стоимости лечения CAR-препаратами возможно использование других стратегий – создание БМКП длительного хранения и внедрение в НК- и НКТ-клетки универсального CAR, который при инфузии с соответствующими антителами будет связываться с широким спектром ОАА. Важным технологическим аспектом является криоконсервация CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток, поскольку этот процесс обеспечивает создание аллогенного БМКП «впрок», что, в свою очередь, обеспечивает непрерывный, менее затратный процесс производства и позволяет проводить пациентам незамедлительное лечение после постановки диагноза. На сегодняшний день проводятся различные исследования, направленные на оптимизацию процесса криоконсервации НК-клеток [205]. Посредством применения этих двух подходов лечение пациента в меньшей степени будет зависеть от даты постановки диагноза и типа рака, а введение БМКП на основе НК- и/или НКТ-клеток решит проблему HLA-несоответствия между донором и реципиентом. Поскольку при использовании CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток не наблюдается тяжелых побочных

эффектов, инфузия модифицированных лимфоцитов и последующее наблюдение за состоянием здоровья пациента могут проводиться в амбулаторных условиях, что значительно снижает связанные с иммунотерапией косвенные расходы пациента и системы здравоохранения.

Таким образом, отсутствие в Российской Федерации зарегистрированного отечественного БМКП на основе НК- и/или НКТ-клеток, а также высокая распространенность онкологических заболеваний делают разработку CAR-НК- и/или CAR-НКТ-продукта весьма востребованным и перспективным направлением. Однако, получение CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток в большом количестве, необходимом для лечения пациентов, является недостаточно изученной исследовательской задачей, включающей результаты использования разрозненных подходов для активации, экспансии и генетической модификации клеток данных популяций без сравнения эффективности используемых методов между собой. Оптимизация методики получения CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток, объединяющей преимущества протоколов, ранее описанных в литературе, является необходимым этапом создания БМКП на основе НК- и/или НКТ-клеток.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика используемых материалов

В качестве источника человеческих мононуклеарных клеток использовалась цельная периферическая кровь условно-здоровых доноров-добровольцев или лейкоцитарно-тромбоцитарный концентрат, полученный из их крови. Забор крови и получение лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата проводились в Отделении переливания крови ФГБУ «НМИЦ Онкологии им. Н. Н. Блохина». Часть образцов была получена в ФГБУ «НИИВС им. И. И. Мечникова». Полученные материалы незамедлительно передавались в лабораторию для проведения дальнейших экспериментов.

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом при ФГБНУ «НИИВС им. И. И. Мечникова». В установленном порядке доноры подписывали информированное согласие на участие в исследовании и согласие на обработку персональных данных.

Ниже приведены критерии включения и исключения для участников исследования.

Критерии включения для здоровых добровольцев:

1. Возраст от 18 до 50 лет;
2. Отсутствие острых или хронических инфекционных заболеваний;
3. Отсутствие онкологических заболеваний.

Критерии исключения:

1. Сопутствующие заболевания иммунной системы;
2. Длительное применение (более 14 дней) иммунодепрессантов или

других иммуномодулирующих препаратов в течение шести месяцев, предшествующих исследованию;

3. Прием антибактериальных препаратов, включая местные препараты, в течение месяца до участия в исследовании.

После выделения МПК из материала, полученного от здоровых добровольцев, проводилась оценка их жизнеспособности, и анализ фенотипа и цитотоксичности. Далее данные клетки проходили этап активации, после чего подвергались трансдукции или длительному культивированию в течение 14-21 дня в присутствии интерлейкинов и/или фидерных клеток. Во время культивирования периодически проводилась оценка деления и жизнеспособности клеточной популяции, а также исследование эффекторной функции и экспрессии различных маркеров. После трансдукции лимфоциты также подвергались длительному культивированию и определению их числа и экспрессии CAR-рецептора.

2.2. Характеристика используемых методов

Ниже представлены различные этапы исследования. Учитывая тип и цель каждого эксперимента, в лабораторных условиях последовательно был проведен ряд манипуляций с моноклеарными клетками человека. Все полученные результаты проходили этап статистической обработки, сравнивались, анализировались и подлежали визуализации. Главными направлениями исследования были оптимизация эффективности трансдукции, изучение различных веществ в качестве активаторов пролиферации лимфоцитов и подбор их оптимальных концентраций, определение воздействия интерлейкинов и/или фидерных клеток на экспансию лимфоцитов.

2.2.1. Характеристика плазмид

Для сборки лентивируса, целевой ген которого несет информацию о репортерном зеленом флуоресцентном белке GFP, использовали плазмиду pLenti-PGK-GFP (L-GFP) (Addgene, США). Плазида содержит также ген устойчивости к антибиотику бластицидину, репортерный ген находится под контролем промотора фосфоглицераткиназы (PGK). Для получения лентивируса, несущего CD16-CAR-трансген, применяли плазмиду pLenti-PGK-CD16-CAR (L-CAR), в которой генетическая последовательность CD16-CAR была клонирована вместо GFP в pLenti-PGK-GFP. Для сборки лентивируса использовали плазмиды pCMV-VSV-G (Addgene, США) и pCMV-ΔR8.2 (Addgene, США).

2.2.2. Характеристика культур клеток

В исследовании использовали адгезионные культуры клеток НЕК 293Т, SKBR3 и T47D-HER2+, а также суспензионные клеточные линии HG3, K562, Jurkat. Все культуры клеток были получены из коллекции клеточных культур ФГБУ «НМИЦ Онкологии им. Н. Н. Блохина». Клетки линии НЕК 293Т, SKBR3, HG3 и K562 культивировались в полной ростовой среде, состоящей из питательной среды ДМЕМ с 4,5 г/л глюкозы (ПанЭко, Россия), 4 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия), 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США) и антибиотика пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, Россия), при температуре +37°C в CO₂-инкубаторе. Клеточную культуру T47D-HER2+ культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10% FBS и антибиотик генетицин (ПанЭко, Россия), и инкубировали при температуре +37°C в CO₂-инкубаторе. Клеточную линии Jurkat выращивали в присутствии среды RPMI-1640, содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 20 мМ HEPES (ПанЭко, Россия) и

пенициллин-стрептомицин, Jurkat инкубировали при температуре +37°C в CO₂-инкубаторе.

2.2.3. Трансформация бактерий и выращивание ночной культуры

Трансформация бактерий *E. coli* штамма XL1blue проводилась с целью создания генетических конструкций и наработки плазмид. Для этого 10 нг ДНК смешивали с клетками *E. coli* (штамм XL1blue) в состоянии компетентности и выдерживали инкубацию в течение 20 мин на льду. Далее смесь подвергали тепловому шоку в течение 30 сек при +42°C и снова инкубировали 5 мин на льду. К смеси добавляли 0,5 мл питательной среды LB (AppliChem GmbH, Германия) и инкубировали 30 мин при +37°C. Далее клеточную суспензию вносили в чашку с LB-агаром (AppliChem GmbH, Германия) и инкубировали в термостате при температуре +37°C в течение ночи. Выросшие изолированные колонии пересеивали на среду LB и культивировали в течение 16-18 ч на термошейкере при 150-200 RPM и +37°C. Затем к каждому 35 мл LB добавляли 35 мкл антибиотика ампициллина (концентрация 50 мг/мл) (Sigma-Aldrich, США), культивировали 12-16 ч при +37°C. После этого центрифугировали 30 мин при 3000 RPM, удаляли супернатант и замораживали осадок при -20°C.

2.2.4. Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК проводилось с помощью коммерческого набора реактивов Endo Free QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen, США) согласно протоколу производителя. Концентрация ДНК после выделения измерялась на приборе NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, США).

2.2.5. Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез в агарозном геле проводили для оценки качества плазмид. Готовили 1% гель агарозы на TAE-буфере (40 mM Трис-ацетат, 2 mM ЭДТА, pH 8,0) с добавлением 0,25 мкг/мл бромистого этидия (Sigma-Aldrich, США). Анализируемый препарат смешивали с буфером для нанесения 6X Loading Dye (Thermo Fisher, США) и с электрофорезным буфером, затем вносили полученные образцы в лунки приготовленного геля в объеме 10-15 мкл/лунку. Электрофорез проводили в течение 30 мин при напряжении 100В с использованием источника тока и электрофорезной камеры (BioRad, США). При длине волны 260 нм получали фотографии геля в проходящем УФ-свете с помощью системы видеодокументации.

2.2.6. Трансфекция клеток НЕК 293Т

Трансфекцию клеточной линии НЕК 293Т проводили с применением кальций-фосфатного метода или с помощью липофектамина.

Кальций-фосфатный метод. За 24 ч до проведения трансфекции клетки НЕК 293Т в концентрации $4 \cdot 10^5$ клеток/см² сеяли на чашку Петри (Costar, США) диаметром 6 см. В день трансфекции готовили смесь из плазмид L-GFP или L-CAR, pCMV-deltaR8.2, pCMV-VSV-G в соотношении 1:2:1 (3:6:3 мкг соответственно), к которой добавляли эквивалентный объем 0,5 М CaCl₂. Далее полученную смесь вносили в двукратный объем 2X буфера HeBS pH=7,02, тщательно перемешивая. Инкубировали в течение 20 мин при +20-23°C и по каплям вносили к клеткам НЕК 293Т в объеме не более 10% от объема культуральной среды. Через 24 ч производили полную замену культуральной среды на свежую. Через 48 и 72 ч после трансфекции клеток НЕК 293Т проводили отбор питательной среды, содержащей вирусные частицы. Полученную таким образом вируссодержащую среду концентрировали и использовали для

трансдукции в свежем виде или замораживали. Эффективность трансфекции определяли через 48 ч после смены модифицированной среды методом проточной цитометрии.

Трансфекция с помощью липофектамина. За 24 ч до проведения трансфекции клетки НЕК 293Т сеяли в культуральный флакон площадью 25 см² (Costar, США) таким образом, чтобы в день трансфекции их конfluence достигла 60-80%. В день трансфекции готовили смесь №1: смешивали плазмиды L-GFP или L-CAR, pCMV-deltaR8.2, pCMV-VSV-G в соотношении 1:1:2 (6 мкг: 6 мкг: 12 мкг), добавляли 24 мкл реагента для трансфекции P3000 (Lipofectamine 3000, Thermo Fisher, США). Смесь №1 инкубировали при +25°C 5 мин. Затем готовили смесь №2, состоящую из 0,4 мл Opti MEM (Gibco, США) и 24 мкл реагента для трансфекции Lipofectamine. Смеси соединяли, тщательно пипетировали и инкубировали при +25°C 30 мин. После инкубации полученную смесь пипетировали и вносили по каплям на клетки НЕК 293Т. Через 24 ч производили полную замену культуральной среды на свежую. Через 48 и 72 ч после трансфекции клеток НЕК 293Т проводили отбор питательной среды, содержащей вирусные частицы. Полученную таким образом вируссодержащую среду концентрировали и использовали для трансдукции в свежем виде или замораживали. Эффективность трансфекции определяли через 48 ч после смены модифицированной среды методом проточной цитометрии.

2.2.7. Концентрирование лентивирусов

Концентрирование лентивирусов проводили с использованием полибрена (Sigma-Aldrich, США) или путем добавления 25%-ного раствора PEG8000 (AppliChem, Германия). При концентрировании с помощью полибрена проводили инкубацию вируссодержащего материала с 16 мкг/мл полибрена в течение 30 мин при +4°C, затем центрифугировали 90 мин при 20 000 g, используя настольную центрифугу universal 320 R (Hettich, Германия). При работе с 25%-ным раствором

PEG8000 вирусосодержащую среду смешивали в соотношении 1:3 с 25%-ным раствором PEG8000 в фосфатном буферном солевом растворе (ФСБ) и инкубировали в термошейкере ES-20 (Biosan, Латвия) при 60 об/мин и +4°C в течение ночи. Далее центрифугировали 1 час при 1600 g и +4°C. Во всех случаях вирусный осадок после центрифугирования растворяли в объеме полной ростовой среды, необходимой для получения 5-кратного или 10-кратного концентрата. Полученные концентраты хранили при -86°C.

2.2.8. Определение функционального титра лентивирусов

За 2 ч до функционального теста проводили посев клеток культуры НЕК 293Т в 12-луночный культуральный планшет в концентрации 3×10^4 клеток на лунку. При проведении функционального теста в каждую лунку с НЕК 293Т добавляли 10-100 мкл вирусного концентрата и 8 мкг/мл полибрена, затем инкубировали клетки при +37°C в CO₂-инкубаторе. Через 24 ч после инкубации производили полную замену культуральной среды на свежую, а через 48 ч – анализировали уровень экспрессии белка GFP методом проточной цитофлуориметрии. Для определения титра лентивируса брали среднее значение триплетов из лунок, в которых доля GFP+клеток не превышала 20%. Титр рассчитывали по формуле:

$$T = (GFP+ \times C_n) / (V \times 100) \times DF \quad (1)$$

где:

T – титр вируса или количество трансдуцирующих единиц на 1 мл, TE/мл;

GFP+ – доля GFP+ клеток, %;

C_n – общее количество инфицированных клеток НЕК 293Т;

V – объем инокулята, мл;

DF – фактор разбавления вируса.

2.2.9. Выделение МПК из периферической крови и лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата

Для получения фракции МПК, источником которой являлась периферическая кровь или лейкоцитарно-тромбоцитарный концентрат крови здоровых доноров-добровольцев, использовали метод седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фиколла ($\rho=1,077$ г/см³). При работе с периферической кровью сбор крови производился в пробирки с ЭДТА, перед выделением она разводилась в 2 раза раствором Хенкса (ПанЭко, Россия). Если источником МПК являлся лейкоцитарно-тромбоцитарный концентрат, то сначала его центрифугировали 10 мин при 1500 g и температуре +23°C и отбирали лейкоцитарный слой, который затем разводили раствором Хенкса в 3 раза. Полученные разведенные образцы крови или лейкоцитарного слоя наслаивали на 1,5 мл фиколла (FICOLL RAQUE, GE HEALTHCARE, США), находящегося на дне центрифужной пробирки на 15 мл, таким образом, чтобы суммарный объем в пробирке не превышал 10-12 мл. Центрифугировали 25 мин при 1500 g и температуре +23°C, отбирали слой моноклеарных клеток, перенося их в другую пробирку. Затем клетки трехкратно отмывали раствором Хенкса: при каждой отмывке добавляли раствор Хенкса до 15 мл, производили центрифугирование в течение 5 мин при 1500 g, +23°C и после этого отбирали надосадочную жидкость. После трехкратной отмывки определяли количество живых клеток и процент жизнеспособности. Для этого клетки смешивали с красителем трипановым синим (ПанЭко, Россия), который окрашивает нежизнеспособные клетки с поврежденной мембраной, в соотношении 1:1 и производили подсчет интересующих параметров в автоматическом счетчике клеток Luna II (Logos biosystems, Республика Корея). Показатель жизнеспособности, превышающий 85%, считали удовлетворительным для проведения дальнейших экспериментов. После подсчета МПК доводили до рабочей концентрации $3,5-4 \times 10^6$ /мл полной культуральной средой, состоящей из

питательной среды ДМЕМ с 4,5 г/л глюкозой, 4 mM L-глутамина, 10% FBS и антибиотика пенициллин-стрептомицина.

2.2.10. Магнитная сепарация

Магнитную сепарацию проводили после выделения МПК и подсчета их количества и жизнеспособности для получения фракции CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов. Для этого готовили буфер для сепарации, состоящий из ФСБ с 2 мл ЭДТА и 0,5% бычьего сывороточного альбумина. Для сепарации использовали разделительные колонки очистки LS Separation Columns (Miltenyi Biotec, США), магнитный сепаратор MidiMACS (Miltenyi Biotec, США), магнитные наносферы для позитивной селекции CD4⁺-клеток (GenScript, США) и CD8⁺-клеток (GenScript, США), которые перед началом сепарации смешивались в равных долях. Магнитную сепарацию проводили согласно протоколу производителя магнитного сепаратора.

2.2.11. Сорбция МАТ для последующей активации МПК

Для сорбции готовили смесь, состоящую из МАТ к CD3-рецептору (BioLegend, США) и МАТ к CD28-рецептору (BioLegend, США) в соотношении 1:2 соответственно, в ФСБ. Диапазон концентраций для анти-CD3-МАТ составлял от 1 мкг/мл до 10 мкг/мл, для анти-CD28-МАТ – от 2 мкг/мл до 20 мкг/мл. Далее по 1 мл полученной смеси добавляли в каждую лунку стерильного 12-ти луночного культурального планшета (SPL life Sciences, Республика Корея) и инкубировали в течение 5 ч при +37°C в CO₂-инкубаторе модели SCO5A (Sheldon Manufacturing Inc, США). Затем проводили трехкратную отмывку от не связавшихся с культуральным пластиком антител используя 1% раствор бычьего сывороточного альбумина (Sigma, Roedermark, Germany) в ФСБ.

2.2.12. Обработка клеточной линии НЕК 293Т Митомицином С

Клетки линии НЕК 293Т сеяли в стерильный 12-луночный культуральный планшет в концентрации $4,5 \times 10^5$ клеток/лунку в присутствии среды ДМЕМ и 10% FBS. На следующий день при достижении 95-100% конфлюэнтности клеток из лунок производили отбор питательной среды и добавляли по 1 мл свежей питательной среды и 7,5 мкг/мл Митомицина С (Sigma-Aldrich, США). Проводили инкубацию в течение 1 ч при $+37^\circ\text{C}$ в CO_2 -инкубаторе. Затем двукратно отмывали лунки с клетками от митомицина С с помощью раствора Хенкса. После второй отмывки добавляли в лунки по 1,5 мл свежей питательной среды, инкубировали в течение 1 ч при $+37^\circ\text{C}$ в CO_2 -инкубаторе. Снова проводили двукратную отмывку раствором Хенкса, после которой добавляли по 2 мл/лунку свежей полной культуральной среды.

2.2.13. Активация МПК

Активацию МПК проводили сразу после выделения и подсчета их количества. В работе использовались различные подходы к активации.

Активация с помощью МАТ к CD3-, CD28-рецепторам. Суспензию МПК в концентрации $3,5\text{-}4 \times 10^6$ /мл вносили к сорбированным МАТ и инкубировали 48 ч при $+37^\circ\text{C}$ в CO_2 -инкубаторе.

Активация с помощью МАТ и FCS. FCS был ранее получен другой исследовательской группой в результате экстракции суммы сульфатированных полисахаридов из дальневосточной голотурии *Cucumaria japonica* и последующего фракционирования с помощью анионообменной хроматографии [206]. По данным химических и физико-химических методов анализа, полисахарид содержал главную цепь из повторяющихся дисахаридных фрагментов $\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GalNAc-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcA-(1}\rightarrow$. В главной цепи сульфатированы по О-4 и О-6 остатки галактозамина и по О-3 (примерно на 33%)

- остатки глюкуроновой кислоты. Остатки α -L-фукозы, преимущественно в виде 3,4- и 2,4-дисульфатированных звеньев в соотношении 4:1, были присоединены в виде единичных боковых ответвлений в положения 3 остатков глюкуроновой кислоты главной цепи. При использовании FCS для активации МПК его добавляли к суспензии свежевыделенных МПК ($3,5-4 \times 10^6$ клеток/мл) в различных концентрациях от 1 мкг/мл до 50 мкг/мл, после чего суспензию клеток вносили в лунки с сорбированными МАТ и инкубировали 48 ч при $+37^\circ\text{C}$ в CO_2 -инкубаторе.

Активация с использованием L-ФГА. Изготавливали растворы L-ФГА (Sigma, США) с различными концентрациями от 5 мкг/мл до 20 мкг/мл путем изменения объема с помощью ФСБ. Далее добавляли исследуемую концентрацию L-ФГА к суспензии МПК, вносили суспензию в 12-луночный культуральный планшет и инкубировали 48 ч в CO_2 -инкубаторе при температуре $+37^\circ\text{C}$.

Активация с использованием КонА. Применение КонА (Sigma, США) для активации МПК проводилось аналогично активации путем добавления L-ФГА, но диапазон концентраций составлял от 2,5 мкг/мл до 15 мкг/мл.

Активация МПК путем соинкубации с клетками линии НЕК 293Т. МПК в объеме 1 мл вносили в лунки 12-луночного культурального планшета, в котором находились обработанные митомицином С клетки НЕК 293Т (95-100% конфлюэнтности). Концентрация вносимых МПК составляла $2,5 \times 10^6$ клеток/мл. Соинкубацию проводили в течение 20 ч при $+37^\circ\text{C}$ в CO_2 -инкубаторе.

По истечению сроков активации лимфоциты переносили в культуральные планшеты, производили оценку количества клеток и их жизнеспособности и доводили до концентрации $3-5 \times 10^5$ клеток/мл полной культуральной средой, содержащей 250 IU/мл человеческого рекомбинантного ИЛ-2, 10 нг/мл человеческого рекомбинантного ИЛ-15 (Sci-Store, Россия) и/или 20 нг/мл человеческого рекомбинантного ИЛ-21 (Peprotech, США).

2.2.14. Активация CD4+ и CD8+ лимфоцитов

После магнитной сепарации полученную фракцию CD4+,CD8+ лимфоцитов активировали с помощью набора для активации Т-клеток Enceed™ T Cell Activation, human (GenScript, США) в присутствии бессывороточной среды Xuri (Xuri, Китай), содержащей 500 IU/мл человеческого рекомбинантного ИЛ-2 (Xuri, Китай), 500 IU/мл человеческого рекомбинантного ИЛ-7 (Xuri, Китай), 500 IU/мл человеческого рекомбинантного ИЛ-15 (Xuri, Китай). Активация проводилась 40 ч при +37°C в CO₂-инкубаторе.

2.2.15. Трансдукция лимфоцитов

Трансдукция лимфоцитов проводилась сразу после их активации. Подсчитывали количество живых клеток с использованием трипанового синего и автоматического счетчика клеток, доводили до концентрации 5×10^5 клеток/мл в полной культуральной среде, вносили по 1 мл клеточной суспензии в лунки 24-луночного культурального планшета (SPL life Sciences, Республика Корея). К клеточной суспензии добавляли 0,5-1 мл/лунку вируссодержащего материала, соотношение лимфоцитов и вирусных частиц составляло от 1:5 до 1:20. Общий объем в каждой лунке был одинаков и составлял 2 мл. В каждую лунку дополнительно добавляли 250 IU/мл ИЛ-2 и полибрен, конечная концентрация которого составляла 8 мкг/мл. Далее проводили спинокуляцию клеток в течение 90 мин при 1500 g и +32°C. После этого клетки тщательно ресуспендировали и инкубировали 24 ч в CO₂-инкубаторе. Из лунок удаляли всю вируссодержащую среду и заменяли ее на свежую, содержащую 250 IU/мл ИЛ-2. Клетки инкубировали при +37°C в CO₂-инкубаторе.

2.2.16. Культивирование лимфоцитов и CAR-лимфоцитов

Длительность культивирования лимфоцитов составляла 14 или 21 день после выделения МПК из источника клеток. Культивирование осуществляли в 12-луночных и 6-луночных культуральных планшетах в присутствии полной культуральной среды (питательная среда ДМЕМ с 4,5 г/л глюкозы, 10% FBS) и цитокинов: ИЛ-2, ИЛ-15 и/или ИЛ-21. Клетки инкубировали при температуре +37°C в CO₂-инкубаторе. Контроль фенотипических характеристик лимфоцитов и визуальный контроль отсутствия микробной контаминации проводили каждые 2-3 дня с помощью световой микроскопии. Оценку жизнеспособности и количества живых клеток проводили с использованием трипанового синего и автоматического счетчика клеток. Показатель жизнеспособности >85-90% считали удовлетворительным. При культивировании концентрацию клеток поддерживали в диапазоне от 3×10^5 /мл до 1×10^6 /мл.

2.2.17. Селекция CAR-лимфоцитов

Отбор CAR-лимфоцитов производился путем добавления антибиотика бластицидина С (InvivoGen, США) в питательную среду в концентрации 10 мкг/мл. Для удаления погибших лимфоцитов, не экспрессирующих CAR и не имеющих ген устойчивости к бластицидину, проводили центрифугирование клеточной суспензии при 1500 g, 5 мин, +23°C, а затем удаляли надосадочную жидкость. Селекция CAR-лимфоцитов осуществлялась с 7 по 21 день культивирования.

2.2.18. Определение пролиферации клеток с помощью N-сукцинимидилового эфира 6-карбоксихлорофлуоресцеина (CFSE)

Чтобы оценить пролиферацию клеток в первые дни после активации использовали витальный флуоресцентный краситель CFSE (Invitrogen, США). Мечение лимфоцитов красителем CFSE проводили после выделения клеток до их активации. К 1 мл клеточной суспензии ($0,5 \times 10^6$ - 10×10^7 клеток/мл) добавляли 110 мкл CFSE, разведенного в 100 раз в ФСБ. Клетки с красителем вортиксировали и инкубировали 5 минут при $+23^\circ\text{C}$ в темноте. Проводили трехкратную отмывку от несвязавшегося красителя. Для этого в центрифужную пробирку на 15 мл, содержащую клеточную суспензию, добавляли до 10 мл раствора, содержащего ФСБ и 5% FBS, центрифугировали 5 мин при 1500 g, $+23^\circ\text{C}$ и удаляли надосадочную жидкость. Оценку пролиферации проводили методом проточной цитометрии, сравнивая анализируемые после активации образцы с немечеными неактивированными клетками (естественная флуоресценция) и мечеными неактивированными клетками (максимальная флуоресценция).

2.2.19. Определение числа лимфоцитов

Для определения количества клеток использовали краситель трипановый синий и автоматический счетчик клеток. Расчет проводили только для живых клеток, погибшие лимфоциты не учитывались. Общий прирост численности клеток определяли по формуле:

$$C_n = M_c \times (N_c / M_s) \quad (2)$$

где:

C_n – общее количество клеток к n-дню, млн/мл;

M_c – количество клеток в m -день при подсчете, млн/мл;

N_c – количество клеток в n -день при подсчете, млн/мл;

M_s – количество клеток в m -день при посеве, млн/мл;

n – день культивирования, в который проводят определение общего количества клеток;

m – предыдущий день подсчета и посева клеток по сравнению с n -днем.

2.2.20. Проточная цитофлуориметрия

Метод проточной цитометрии использовался для оценки пролиферации лимфоцитов, меченных CFSE, анализа эффективности трансдукции и трансфекции и определения экспрессии рецепторов на клеточной мембране. Для этого жизнеспособные клетки доводили до концентрации 1×10^6 /мл раствором Хенкса. Отбирали 100 мкл клеточной суспензии и добавляли меченые флуорохромом МАТ в концентрациях, рекомендованных производителем МАТ. Производили инкубацию в течение 30 мин, при $+4^\circ\text{C}$ в темноте. Далее проводили трехкратную отмывку раствором ФСБ от несвязавшихся антител, центрифугируя в течение 5 мин при 1500 g и температуре $+23^\circ\text{C}$ и удаляя надосадочную жидкость. После этапа отмывки в осадку клеток добавляли 200 мкл ФСБ и, в части экспериментов, раствор пропидия йодида (PI) до конечной концентрации 30 нг/мл (Sigma, США). Комбинацию меченных флуорохромами антител для обработки проб подбирали с учетом особенности диапазона детекции длины волны каждого флуорохрома. Цитометрию проводили на проточном цитофлуориметре Novocyte (ACEA Biosciences Inc, США) с использованием программного обеспечения Novo-Express 1.5.0. Погибшие клетки исключали из анализа по показателям рассеивания. Анализировали не менее 10 тыс. живых клеток.

В работе использовали следующие меченые флуорохромами МАТ:

- анти-CD3-PerCP (BD Pharmingen, США);
- анти-CD3-FITC (Beckman Coulter, США);
- анти-CD56-PE (Life Technologies, США);
- анти-CD(56+16)-PE (Beckman Coulter, США);
- анти-CD8-APC (Invitrogen, США);
- анти-CD4-FITC (BD Pharmingen, США);
- анти-CD16-FITC (BD Pharmingen, США);
- анти-CD16-PE (BD Pharmingen, США);
- анти-NKp30 /CD337-PE (BD Pharmingen, США);
- анти-NKG2D/CD314-APC (BD Pharmingen, США);
- анти-CD25-APC (BD Pharmingen, США);
- анти-CD38-FITC (BD Pharmingen, США);
- анти-CD69-PE (BD Pharmingen, США).

2.2.21. Цитотоксический тест

При проведении цитотоксического теста в качестве культур-мишеней использовали клеточные линии HG3, K562 и T47D-HER2+. В лунки стерильного 96-луночного планшета (SPL life Sciences, Республика Корея) вносили выбранную культуру клеток-мишени (М) в следующей концентрации: 1×10^4 клеток/лунку HG3; 1×10^4 клеток/лунку K562; $0,5 \times 10^4$ клеток/лунку T47D-HER2+. Далее вносили клетки-эффекторы (Э), соотношение Э: М всегда составляло 5:1. Для оценки антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) в лунки дополнительно вносили анти-HER2 МАТ Герцептин (Трастузумаб) (Roche, Швейцария) в конечной концентрации 5 мкг/мл при использовании в качестве мишени клеточную линию T47D-HER2+, или анти-CD20 МАТ Ритуксимаб (Roche, Швейцария) в конечной концентрации 5 мкг/мл при использовании в качестве мишени линию HG3. В некоторых экспериментах в анализируемые

лунки добавляли 5 мкг/мл FCS. Конечный объем в каждой лунке составлял 220 мкл. В лунки отрицательного контроля клеточных культур вместо лимфоцитов вносили эквивалентный объем полной культуральной среды. Аналогично в лунки отрицательного контроля лимфоцитов не вносили клетки-мишени и доводили общий объем в лунке до 220 мкл. Планшет инкубировали при температуре +37°C в течение суток в CO₂-инкубаторе. Затем в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора резазурина (Sigma-Aldrich, США) согласно протоколу AlamarBlue Cell Viability Reagent Product Information Sheet (Pub. No. MAN0018317 C.0). Планшет снова инкубировали при температуре +37°C в течение суток в CO₂-инкубаторе. Далее измеряли интенсивность флуоресценции на мультирежимном планшетном ридере Spark (Tecan, Швейцария). Анализ проводили при длине возбуждения 560 нм и длине эмиссии 600 нм с использованием программного обеспечения Sparkcontrol v3.1.

Цитотоксическую активность (процент погибших клеток-мишеней) оценивали по формуле:

$$\text{Цитотоксическая активность (\%)} = (1 - ((\text{Э} + \text{М}) - \text{Э} / \text{М}) \times 100 \quad (3)$$

где:

Э+М – среднее значение интенсивности флуоресценции для трех аналогичных лунок, в которых находились Э и М;

Э – среднее значение интенсивности флуоресценции для трех аналогичных лунок, в которых находились только Э;

М – среднее значение интенсивности флуоресценции для трех аналогичных лунок, в которых находились только М.

2.2.22. Статистическая обработка данных

Обработку и анализ данных проводили с использованием программных обеспечений Microsoft Excel 2019 (Microsoft, США) и GraphPad ver.10 (GraphPad Software Inc., США). Данные экспериментов представлены в работе как среднее значение \pm SD. Результаты проанализированы с использованием Statistica 10. Тест ANOVA с критерием Tukey HSD использовался для оценки различий. Достоверными считали значения $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно литературным данным, чаще всего для *in vitro* экспансии НК-клеток используют интерлейкины, фидерные клетки и МАТ к CD3-, CD28-рецепторам, длительность культивирования НК- и НКТ-клеток в большинстве протоколов составляет 21 день. Обогащение популяций лимфоцитов также возможно путем разделения клеточных популяций с помощью магнитной сепарации. В данной работе проводили экспансию НК- и НКТ-клеток путем длительного культивирования (14 или 21 день) в первичной культуре МПК без разделения клеточных популяций. Сразу после выделения МПК проводили стимуляцию пролиферации с помощью веществ-активаторов, затем выращивали клетки при добавлении цитокинов. Также в исследовании использовали аллогенные фидерные клетки, соинкубацию с которыми проводили после выделения МПК или на более поздних сроках культивирования. Генетическую модификацию МПК с целью получения CAR-лимфоцитов проводили сразу после этапа активации. Исходя из поставленных задач, данное исследование объединяет 4 направления:

- Определение эффективного активатора пролиферации нецитокинового происхождения для экспансии НК- и НКТ-клеток;
- Подбор комбинации цитокинов, приводящей к пролиферации НК- и НКТ-клеток;
- Оптимизация методики соинкубации МПК с фидерными клетками линии НЕК 293Т;
- Сравнение методик для создания CAR-лимфоцитов с целью получения высокой экспрессии CAR-транскгена.

3.1. Воздействие различных комбинаций интерлейкинов на пролиферацию и цитотоксичность НК- и НКТ-клеток

С целью подбора оптимальной комбинации цитокинов, обеспечивающей активацию, пролиферацию и поддержание эффекторных функций культивируемых лимфоцитов, определяли общее число МПК, экспрессию активационных маркеров, а также проводили оценку популяционного состава первичной культуры МПК и ее цитотоксической активности. В литературе, описывающей методы культивирования НК-клеток, чаще всего используются ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21. ИЛ-2 активирует группу различных рецепторов естественной токсичности и NKG2D-рецептор, усиливает пролиферацию и цитотоксичность НК-клеток [187]. ИЛ-15 повышает противоопухолевую активность НК-клеток [188], а ИЛ-21 участвует в дифференцировке НК-клеток из ГСК/ГПК и усиливает цитотоксичность и секрецию цитокинов [190]. Мы решили исследовать данные цитокины в комбинациях ИЛ-2+ИЛ-15 и ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21 (Рисунок 1). В качестве группы контроля мы использовали клетки, культивируемые в присутствии только ИЛ-2. В данной серии экспериментов первичную культуру лимфоцитов активировали с помощью сорбированных в культуральной планшете МАТ к CD3-, CD28-рецепторам, поскольку данный вариант активации используется в большинстве протоколов для экспансии НК- или Т-клеток.

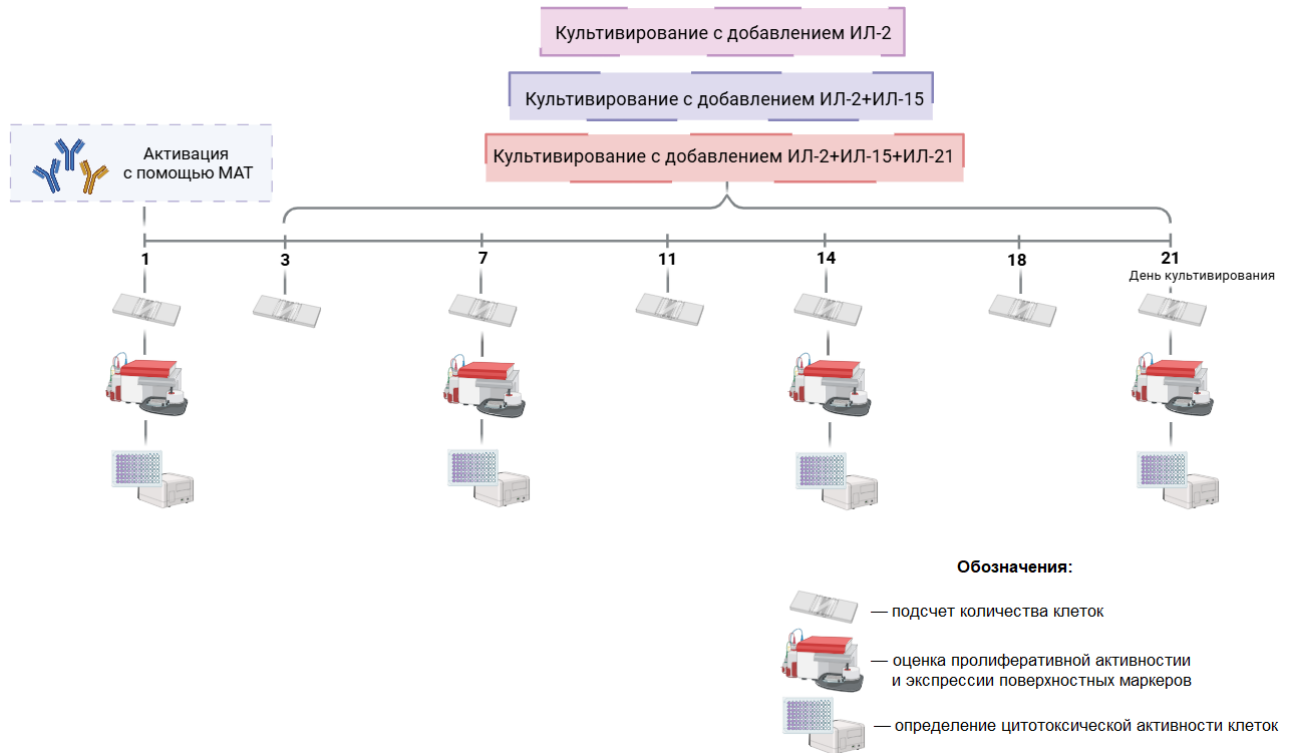


Рисунок 1 – Дизайн исследования, направленного на изучение воздействия комбинаций цитокинов на НК- и НКТ-клеток

Наибольший прирост численности МПК к концу срока культивирования наблюдали при культивировании клеток в присутствии ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21 (Рисунок 2). При культивировании с добавлением ИЛ-2+ИЛ-15 определяли статистически достоверное увеличение численности МПК в интервале с 14-го по 18-й день в сравнении с добавлением только ИЛ-2, затем, к 21-му дню, количество клеток в обеих группах сравнялось.

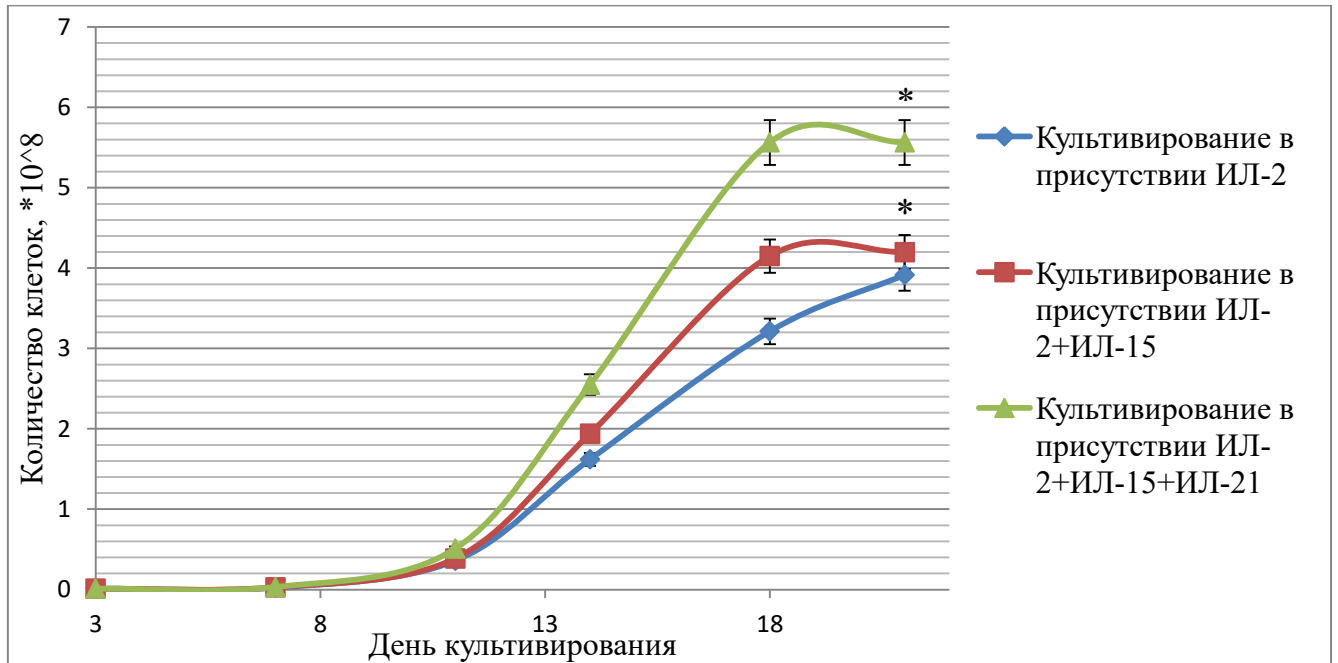


Рисунок 2 – Динамика пролиферативной активности лимфоцитов в зависимости от интерлейкинов, присутствующих в питательной среде, * $p < 0,05$

На следующем этапе мы изучали экспрессию активационных маркеров на поверхности клеток, а также соотношение популяций лимфоцитов. В качестве маркеров активации использовали NKG2D (рецептор, экспрессирующийся на Т-, НК- и НКТ-клетках, распознающий опухолевые клетки) и NKp30 (активирующий рецептор НК-клеток). Также мы определяли долю клеток, экспрессирующих CD16, – рецептор для иммуноглобулинов класса G (IgG). При изучении активаторов пролиферации экспрессия эндогенного CD16 являлась одним из критериев сравнения методов культивирования клеток, поскольку в данной работе в качестве CAR-рецептора использовали «универсальный» CAR, сконструированный на основе CD16-рецептора. Определение экспрессии маркеров на поверхности лимфоцитов проводили сразу после выделения клеток (до инкубации), а также на 7-й, 14-й и 21-й день культивирования (Приложение А.1 и А.2).

При любом режиме культивирования наблюдали увеличение доли CD3+CD56-Т-лимфоцитов до 89,0-99,9% на 7-й день культивирования, затем их относительное количество плавно снижалось до 35,3-63,2% вследствие увеличения доли CD3+CD56+НКТ-клеток. Следует отметить, что выраженный

прирост доли CD56+лимфоцитов (с $14,5\pm 4,2\%$ в начале культивирования до $38,4-65,0\%$ на 21-й день исследования) был тесно связан с увеличением доли CD3+CD56+НКТ-клеток, которые к концу срока культивирования преобладали не только среди CD56+лимфоцитов, но и среди всех клеточных популяций первичной культуры МПК. Также наблюдали постепенное увеличение экспрессии маркера активации NKG2D, число NKG2D+клеток составляло $68,5-84,7\%$ к концу срока культивирования.

В зависимости от добавляемых цитокинов экспрессия тех или иных маркеров была различна. Так, наибольшее увеличение доли CD56+клеток (до $59,7\pm 5,3\%$ к концу срока культивирования) наблюдали при наличии в питательной среде всех трех цитокинов, в то время как при культивировании в присутствии только ИЛ-2 доля CD56+лимфоцитов была $42\pm 4\%$, а при добавлении ИЛ-2+ИЛ-15 – $45\pm 4\%$. Доля CD3-CD56+НК-клеток в зависимости от добавления интерлейкинов менялась незначительно, тем не менее, при добавлении ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21 наблюдали тенденцию к увеличению, по сравнению с другими режимами культивирования, доли НК-клеток до $1,1\pm 0,2\%$. При культивировании с ИЛ-2 доля CD3-CD56+НК-клеток к 21-му дню культивирования составила $0,2\pm 0,1\%$, при культивировании с ИЛ-2+ИЛ-15 – $0,1\pm 0,1\%$.

Наибольшая, по сравнению с другими режимами культивирования, экспрессия активационного маркера NKG2D, главным образом, за счет прироста популяции CD56+NKG2D+клеток, была выявлена среди МПК, культивируемых с ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21. Доля CD56+NKG2D+клеток к 21-му дню культивирования составляла $50\pm 4\%$ при добавлении ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21, $36\pm 4\%$ при добавлении только ИЛ-2 и $34\pm 3\%$ при добавлении ИЛ-2+ИЛ-15. К концу срока культивирования 86% всех CD56+клеток экспрессировали активационный маркер NKG2D, что свидетельствует об их активации и пролиферации.

При добавлении комбинации цитокинов ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21 наблюдали наиболее низкий уровень экспрессии NKp30-рецептора в сравнении с другими режимами культивирования в течение всего срока исследования. Так, доля

NKp30+лимфоцитов составляла $2,3 \pm 0,3\%$ при культивировании в присутствии ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21, $6,5 \pm 0,8\%$ при использовании только ИЛ-2 и $6,1 \pm 0,7\%$ при добавлении в питательную среду ИЛ-2+ИЛ-15. Отмечалось перераспределение экспрессии данного маркера на разных субпопуляциях клеток: в начале культивирования (до активации) его выявляли преимущественно на поверхности CD56+лимфоцитов, в то время как на более поздних сроках (к 21-му дню) возрастала доля CD3+NKp30+клеток. Наблюдаемое увеличение уровня NKG2D и, напротив, снижение экспрессии NKp30-рецептора, показанное в данной работе, согласуется с результатами других научных исследований. Так в условиях невысокой экспрессии NKp30 на поверхности клеток, в качестве активационного маркера для реализации цитотоксичности начинает использоваться NKG2D-рецептор [212]. Статистически значимого различия в экспрессии CD16-рецептора в зависимости от присутствующих в питательной среде цитокинов выявлено не было.

Зная общее количество МПК, а также доли CD3-CD56+НК-клеток, CD3+CD56+НКТ-клеток и CD3+CD56-Т-лимфоцитов мы определяли абсолютное число клеток данных популяций. Статистически значимое возрастание количества CD3-CD56+НК-клеток и CD3+CD56+НКТ-клеток по сравнению с другими режимами активации было установлено при культивировании МПК в присутствии ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21 (Таблица 1).

Таблица 1 – Абсолютное число МПК на 21-й день культивирования в зависимости от добавляемых в питательную среду интерлейкинов

Показатель	МПК до активации	Культивирование с ИЛ-2	Культивирование с ИЛ-2, ИЛ-15	Культивирование с ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-21
Общее количество клеток, $\cdot 10^6$	$3,0 \pm 0,0$	$391,1 \pm 40,1$	$420,3 \pm 35,4$	$556,3 \pm 50,9$
Количество CD3-CD56+ клеток, $\cdot 10^6$	$0,3 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$6,0 \pm 0,7$
Количество CD3+CD56+ клеток, $\cdot 10^6$	$0,13 \pm 0,1$	$165,2 \pm 15,4$	$187,2 \pm 19,1$	$326,5 \pm 36,3$
Количество CD3+CD56-клеток, $\cdot 10^6$	$1,8 \pm 0,2$	$222,9 \pm 29,7$	$231,4 \pm 40,1$	$221,0 \pm 29,7$

Цитотоксическую активность культивируемых МПК изучали, используя в качестве мишени суспензионную культуру клеток В-клеточной лимфомы HG3, при проведении цитотоксического теста соотношение эффектор: мишень равнялось 5:1. При длительном культивировании наблюдали постепенное увеличение цитотоксической активности клеток при всех режимах культивирования (Таблица 2). Наибольшая цитотоксичность была установлена для МПК, которые выращивались при добавлении только ИЛ-2 или комбинации ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21. Возможно, возрастание эффекторной функции связано с пролиферацией CD3+CD56+НКТ-клеток, обладающих цитотоксичностью и экспрессирующих активационный маркер NKG2D.

Таблица 2 – Цитотоксичность МПК при длительном культивировании при добавлении различных комбинаций интерлейкинов

Длительность культивирования	Процент погибших клеток HG3		
	Культивирование с ИЛ-2	Культивирование с ИЛ-2, ИЛ-15	Культивирование с ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-21
МПК до активации	52,5±4,6		
7-й день культивирования	54,0±5,7	52,7±6,0	59,3±6,2
14-й день культивирования	70,2±7,0	55,3±5,8	76,8±6,0
21-й день культивирования	72,4±5,8	60,1±5,2	78,9±4,6

Культивирование в присутствии ИЛ-2+ИЛ-15, напротив, привело к статистически достоверному снижению цитотоксической активности клеток на 14-й и 21-й день по сравнению с другими режимами культивирования. Снижение цитотоксичности может быть связано с истощением клеточной популяции при данном режиме культивирования [207]. При добавлении ИЛ-21 при культивировании МПК происходит предотвращение ИЛ-15-индуцированного истощения лимфоцитов [207], что подтверждается в нашем исследовании.

Согласно результатам, полученным в данной работе, наибольшая экспансия CD3-CD56+НК-клеток и CD3+CD56+НКТ-клеток наблюдается при культивировании с добавлением ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21. При данном режиме

культивирования наблюдали самую высокую сравнительную экспрессию активационного маркера NKG2D на поверхности CD56+клеток, а также высокую цитотоксическую активность первичной культуры МПК. Наряду с ИЛ-2 и ИЛ-15, ИЛ-21 характеризуется проявлением широкого спектра активирующего воздействия на различные популяции клеток врожденного и приобретенного иммунитета [208]. Его присутствие влияет на созревание и пролиферацию НК-клеток, повышает их выживаемость и противоопухолевую активность [207]. ИЛ-21 поддерживает пролиферацию НКТ-клеток, усиливает противоопухолевую активность и формирует долгоживущую популяцию CD62L+НКТ-клеток [209].

Необходимо подчеркнуть, что в данной серии экспериментов активацию деления лимфоцитов проводили при помощи «классического» Т-клеточного активатора (МАТ к CD3-, CD28-рецепторам), активно используемого в протоколах экспансии для Т-клеток. Данный способ активации, воздействуя на Т-клеточный рецептор, стимулирует также и пролиферацию НКТ-клеток, а секретируемые при этом провоспалительные цитокины оказывают положительное влияние на НК-клетки. Активированные Т-лимфоциты в данной серии экспериментов выступали только в качестве аутологичных фидерных клеток, однако, необходимо учитывать их вклад в прирост общего числа клеток и цитотоксическую активность культуры. Активация первичной культуры МПК с помощью МАТ к CD3-, CD28-рецепторам и последующее культивирование с добавлением ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21 в течение 21 дня приводит к эффективному обогащению МПК CD3+CD56+НКТ-клетками и менее выраженному увеличению числа CD3-CD56+НК-клеток. Для большей экспансии НК-клеток необходимо использование других подходов к обогащению.

Результаты, изложенные в разделе 3.1, были опубликованы в [210].

3.2. Особенности экспансии и фенотипических характеристик первичной культуры МПК человека под действием различных активаторов пролиферации

Этап активации пролиферации лимфоцитов является неотъемлемой частью описанных в литературе протоколов по созданию CAR-лимфоцитов, так как позволяет увеличивать число культивируемых клеток и их восприимчивость к генетическим модификациям. В данной серии экспериментов проводили оценку влияния различных веществ-активаторов нецитокинового происхождения на пролиферацию, фенотипические характеристики и цитотоксичность первичной культуры МПК человека без разделения клеточных популяций. В качестве активаторов мы использовали МАТ к CD3-, CD28-рецепторам, L-ФГА, КонА, а также комбинацию МАТ к CD3- и CD28-рецепторам + FCS (Рисунок 3). Выделенные из периферической крови или лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата МПК добавляли к сорбированным МАТ или помещали в питательную среду, содержащую L-ФГА или КонА. При активации комбинацией МАТ + FCS, FCS добавляли к питательной среде, содержащей свежесыведенные МПК, а затем вносили суспензию клеток в лунки с собираванными МАТ.

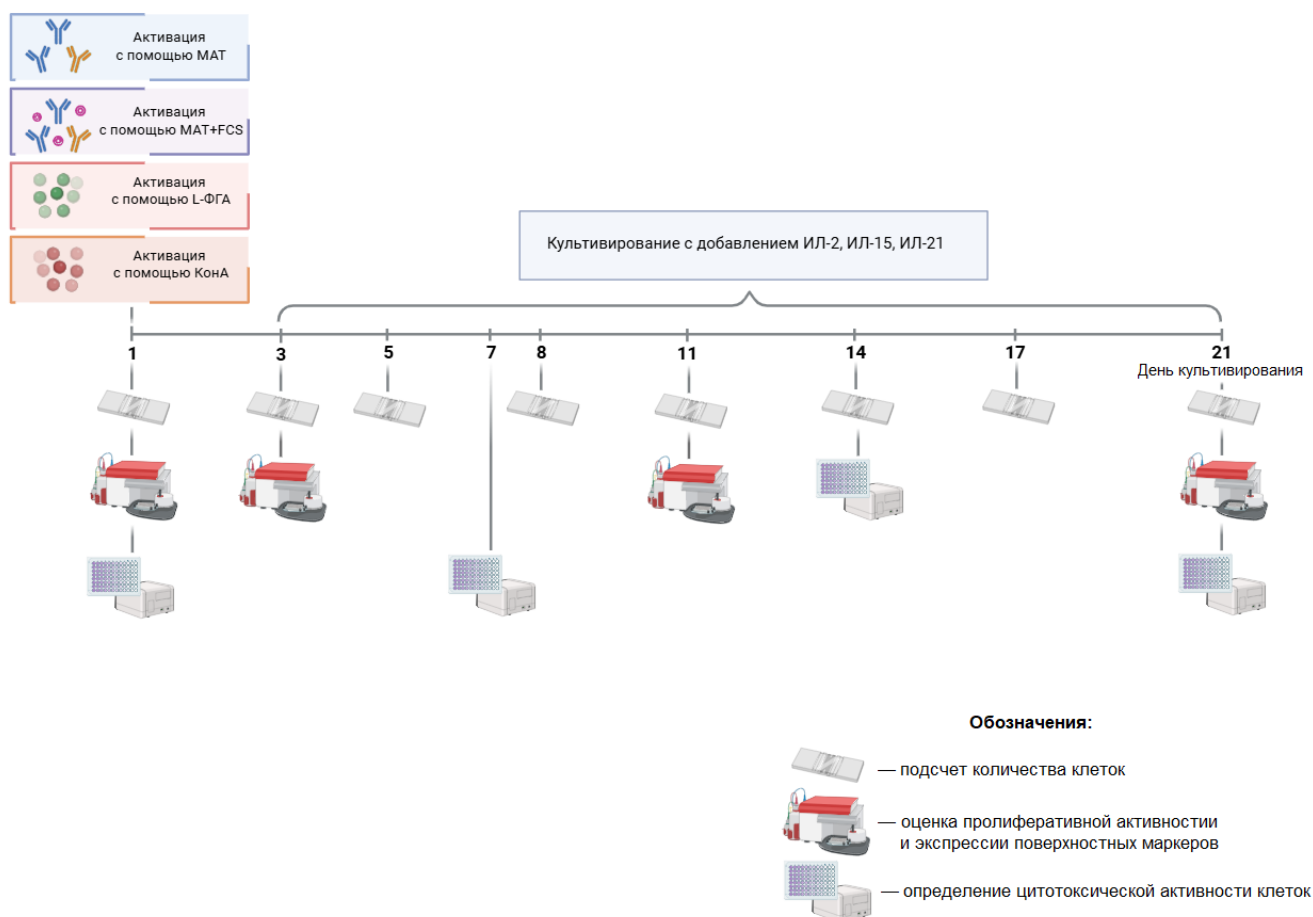


Рисунок 3 – Дизайн исследования активаторов пролиферации нецитокинового происхождения

3.2.1. Оценка действия активаторов в первые сутки после активации

На первом этапе были подобраны оптимальные концентрации активаторов, вызывающие наиболее активную пролиферацию клеток без истощения лимфоцитов. Деление клеток оценивали на 5-й день после добавления активаторов, использовали следующие концентрации веществ:

Для МАТ (соотношение анти-CD3-МАТ к анти-CD28-МАТ всегда равнялось 1: 2):

- 1 мкг/мл анти-CD3, 2 мкл/мл анти-CD28
- 2,5 мкг/мл анти-CD3, 5 мкл/мл анти-CD28
- 5 мкг/мл анти-CD3, 10 мкл/мл анти-CD28
- 10 мкг/мл анти-CD3, 20 мкл/мл анти-CD28

Для L-ФГА:

- 5 мкг/мл L-ФГА
- 10 мкг/мл L-ФГА
- 15 мкг/мл L-ФГА
- 20 мкг/мл L-ФГА

Для Кона:

- 2,5 мкг/мл Кона
- 5 мкг/мл Кона
- 10 мкг/мл Кона
- 15 мкг/мл Кона

Максимальную пролиферацию клеток наблюдали при следующих концентрациях: 2,5 мкг/мл анти-CD3-МАТ, 5 мкг/мл анти-CD28-МАТ; 5 мкг/мл и 10 мкг/мл L-ФГА; 5 мкг/мл и 2,5 мкг/мл Кона (Рисунок 4). В дальнейших экспериментах использовали 2,5 мкг/мл анти-CD3-МАТ, 5 мкг/мл анти-CD28-МАТ; 5 мкг/мл L-ФГА; 5 мкг/мл Кона.

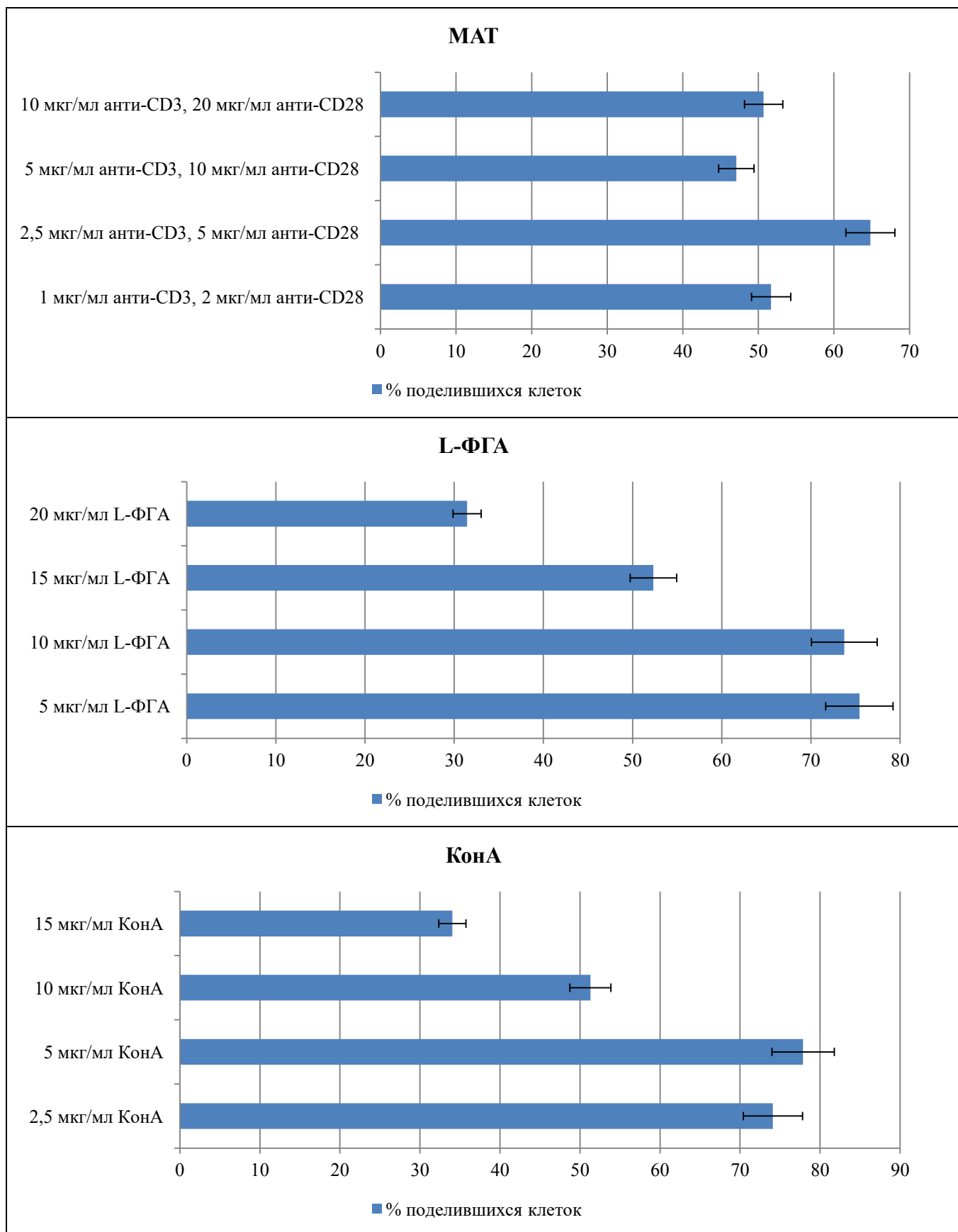


Рисунок 4 – Процент поделившихся клеток в зависимости от способа активации и концентрации активатора

Так как использование FCS является малоизученным подходом для активации МПК, то прежде всего мы определили отсутствие токсичности данного вещества для иммунных клеток путем добавления FCS при проведении цитотоксического теста (Рисунок 5). В качестве клеток-мишеней использовали линию клеток аденокарциномы молочной железы SKBR3, соотношение эффектор: мишень составляло 5:1. Статистически достоверного снижения цитотоксичности клеток в присутствии FCS выявлено не было, что позволило приступить к изучению активирующего воздействия FCS на первичную культуру МПК.

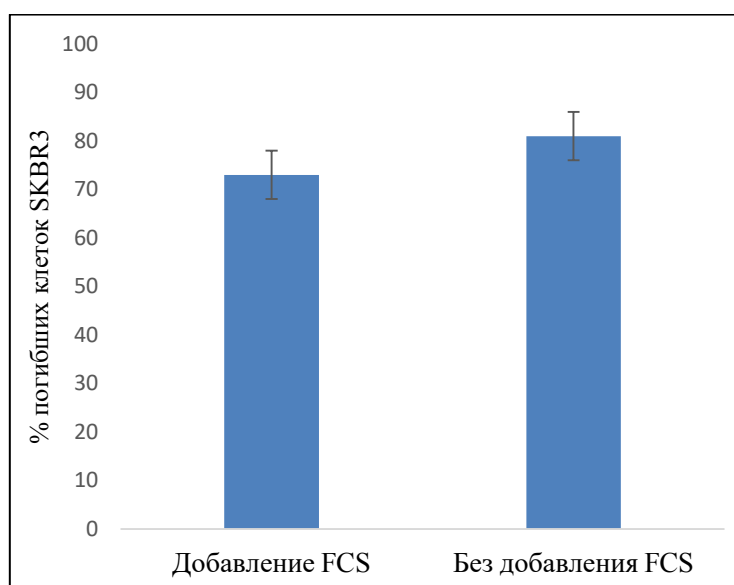


Рисунок 5 – Цитотоксичность в отношении культуры SKBR3

Как было описано выше, FCS использовали только вместе с МАТ. Подбор оптимальной концентрации FCS осуществляли при использовании подобранной ранее концентрации МАТ (2,5 мкг/мл анти-CD3-МАТ, 5 мкг/мл анти-CD28-МАТ). FCS использовали в концентрациях 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 25 мкг/мл и мкг/мл. Для FCS в качестве рабочей концентрации было выбрано 5 мкг/мл данного вещества (Рисунок 6), так как дальнейшее повышение концентрации не вызывало пропорционального роста доли поделившихся клеток. В последующих экспериментах использовали только данные концентрации активаторов.

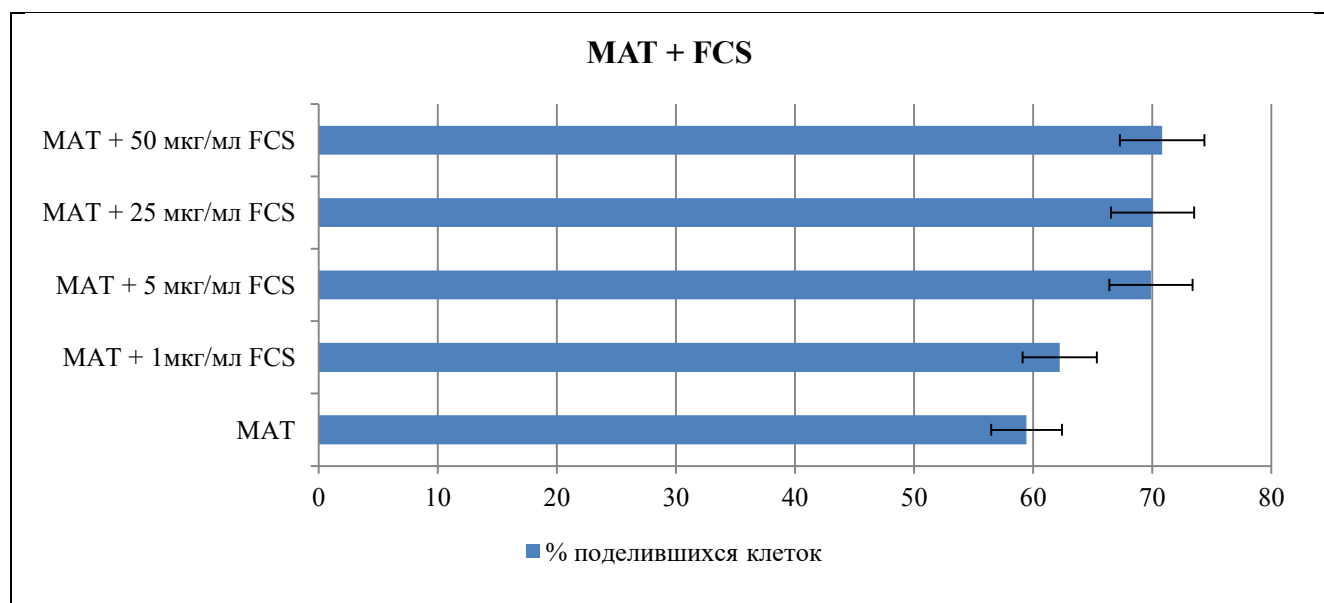


Рисунок 6 – Процент поделившихся клеток в зависимости от концентрации FCS

Далее проводили сравнительный анализ активации и деления МПК под действием различных активаторов, оценивая интенсивность пролиферации и экспрессию ранних маркеров активации на 3-й день после активации. В качестве маркеров использовали NKG2D (рецептор, распознающий опухолевые клетки и экспрессирующийся на Т-, НК- и НКТ-клетках), NKp30 (активирующий рецептор НК-клеток), CD38 (трансмембранный гликопротеин, экспрессирующийся на активированных иммунных клетках), CD69 (самый ранний маркер пролиферации лимфоцитов) и CD25 (высокоаффинный рецептор для ИЛ-2, обеспечивающий опосредование пролиферации Т-клеток).

Было установлено, что уже на 3-й день активации пролиферативная активность МПК достоверно возрастала, однако статистически значимого различия в группах клеток, подверженных различными способами активации, выявлено не было (Таблица 3).

Таблица 3 – Проллиферативная активность лимфоцитов на 3-й день после активации

Концентрация активатора	Процент поделившихся клеток	*p < 0,05 по сравнению с неактивированными МПК
Неактивированные МПК	7,0±1,5	
2,5 мкг/мл анти-CD3, 5 мкг/мл анти-CD28	43,2±2,1*	
2,5 мкг/мл анти-CD3, 5 мкг/мл анти-CD28 + 5 мкг/мл FCS	43,4±3,4*	
5 мкг/мл L-ФГА	42,3±3,2*	
5 мкг/мл Кона	39,7±1,9*	

На 3-й день после начала стимуляции пролиферации при использовании активаторов увеличивалась экспрессия таких активационных маркеров, как NKG2D, CD38, CD69 и CD25 (Таблица 4), и снижалась доля NKp30+клеток. Добавление FCS вызывало более выраженную экспрессию CD38, CD69, CD25 маркеров, причем существенно возрастала доля CD56+CD25+ клеток (в сравнении с активацией только МАТ). Поскольку при стимуляции L-ФГА на 3-й день после активации наблюдали самую высокую экспрессию CD25-маркера, особенно на поверхности CD56+клеток, можно предположить, что данное вещество способно активировать CD56+клетки с наибольшей эффективностью по сравнению с рассматриваемыми в данной работе активаторами.

Таблица 4 – Экспрессия активационных маркеров на 3-й день после активации различными способами

Показатель	Способ активации				
	МПК до активации	МАТ	МАТ + FCS	L-ФГА	Кона
Доля NKG2D+ клеток, %	15,2±3,0	26,3±1,6	25,8±3,4	28,7±3,0	29,4±2,1
Доля NKp30+ клеток, %	37,0±5,1	20,7±1,9	18,4±2,3	14,0±4,0	10,6±3,4
Доля CD38+ клеток, %	1,0±0,7	82,1±4,0	83,8±7,2	91,8±6,5	99,6±1,0
Доля CD69+ клеток, %	0,2±0,1	80,5±4,0	85,3±4,7	94,0±3,7	94,0±5,0

Продолжение Таблицы 4

Показатель	Способ активации				
	МПК до активации	МАТ	МАТ + FCS	L-ФГА	КонА
Доля CD3+CD25+ клеток, %	1,3±0,4	35,1±3,4	57,3±5,8	73,8±4,5	72,8±6,0
Доля CD56+CD25+ клеток, %	0,6±0,2	1,9±0,1	5,9±1,4	6,9±1,1	5,1±1,8

3.2.2. Оценка пролиферации и цитотоксической активности первичной культуры МПК при длительном культивировании после стимуляции различными активаторами пролиферации

Поскольку, как было указано выше, средняя продолжительность культивирования НК- и НКТ-клеток составляет 21 день, было необходимо оценить влияние активаторов на первичную культуру МПК при длительном культивировании (Рисунок 3). Количество клеток, взятых для активации, было одинаковым для любого способа активации и составляло 3 млн. После активации МПК культивировали при добавлении ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21. Наибольший прирост общего числа лимфоцитов наблюдали при активации МАТ+FCS, а наименьший – при активации с помощью КонА (Рисунок 7).

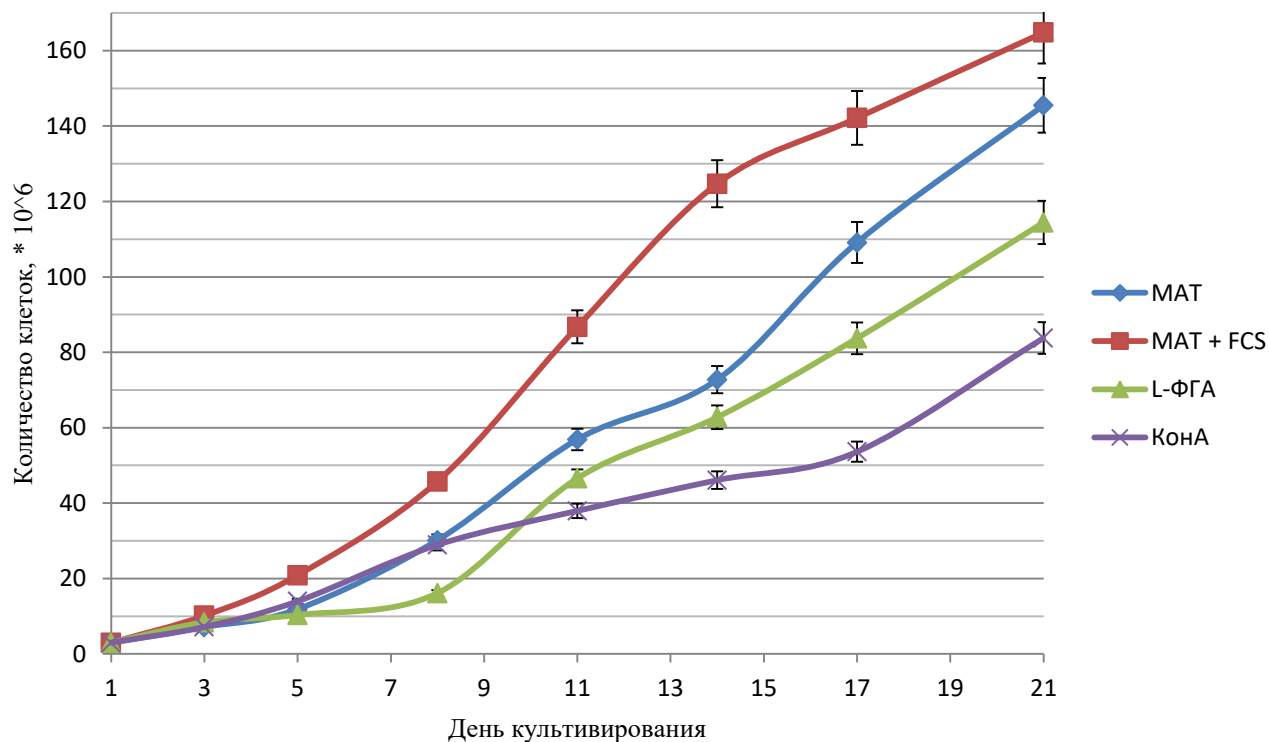


Рисунок 7 – Изменение общего числа лимфоцитов в динамике культивирования в зависимости от способа активации

Учитывая общее количество культивируемых клеток и долю субпопуляций, было установлено, что абсолютное число CD3-CD56+НК-клеток было наибольшим при активации L-ФГА (Таблица 5). Самая высокая пролиферация CD3+CD56+НКТ-клеток наблюдалась при активации с помощью MAT+FCS.

Таблица 5 – Абсолютное число клеток различных популяций на 21-й день культивирования

Показатель	Способ активации				
	МПК до активации	MAT	MAT+FCS	L-ФГА	Кона
Общее количество клеток, *10 ⁶	3,0±0,0	145,2±12,1	167,3±9,2	114,2±12,3	84,1±9,1
Количество CD3+CD56-клеток, *10 ⁶	2,1±0,2	66,7±6,5	68,3±7,1	98,2 ± 1,1	66,9 ± 6,9
Количество CD3-CD56+клеток, *10 ⁶	0,4±0,1	2,9±0,3	3,0±0,4	7,1±0,8	4,8±0,5
Количество CD3+CD56+клеток, *10 ⁶	0,2±0,0	75,8±7,8	94,1±9,6	6,2±0,8	11,6±1,4

При изучении цитотоксической активности культивируемых клеток в отношении культуры клеток карциномы молочной железы, экспрессирующей HER-рецептор, T47D-HER2+ (соотношение эффектор: мишень 5:1) было определено постепенное увеличение цитотоксичности к клеткам-мишеням к 21-му дню культивирования не зависимо от способа активации (Таблица 6). Статистически достоверного отличия в цитотоксической активности иммунных клеток, активированных разными вариантами, выявлено не было.

Таблица 6 – Цитотоксичность МПК при длительном культивировании

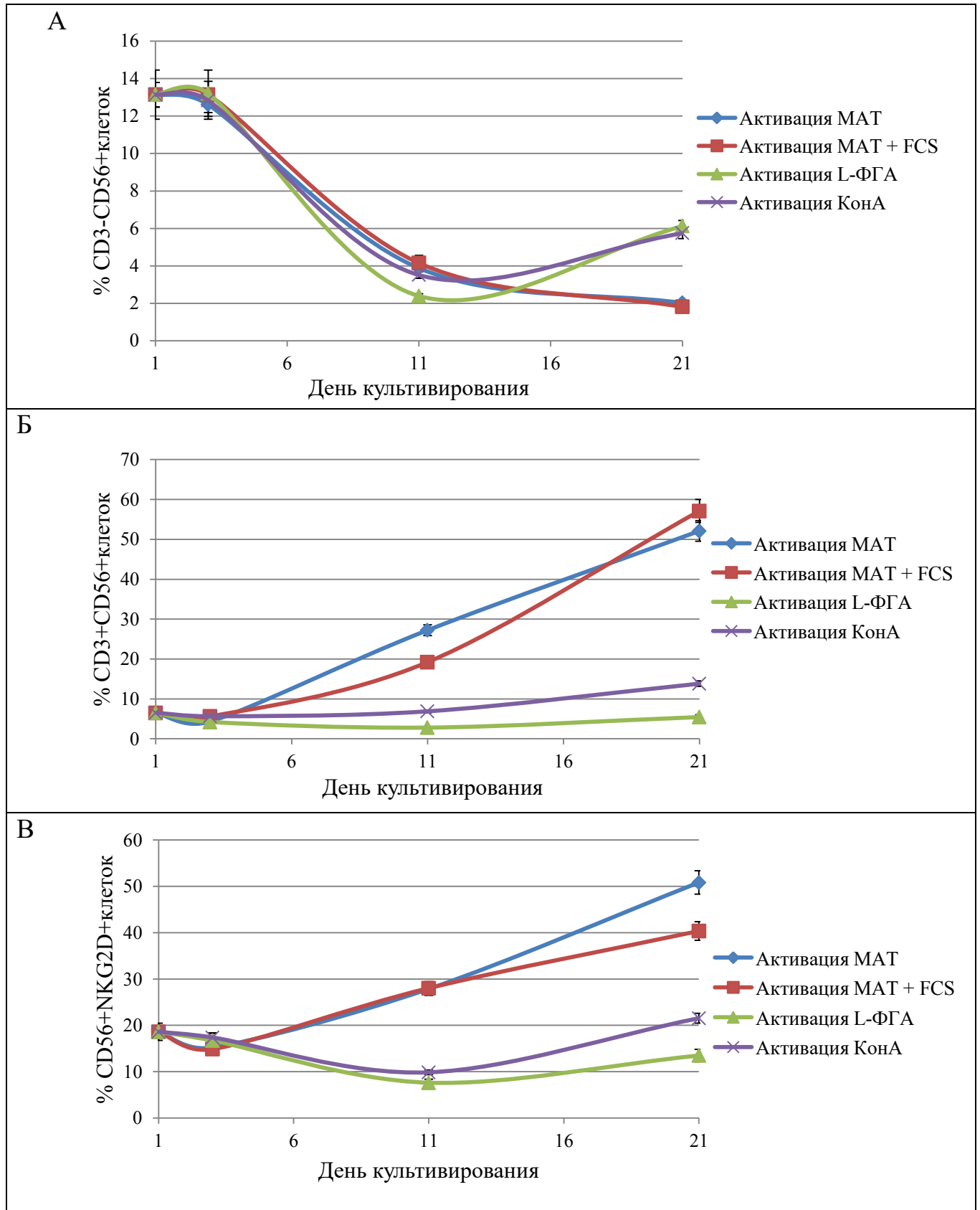
Длительность культивирования	Процент погибших клеток T47D-HER2+			
	После активации МАТ	После активации МАТ+FCS	После активации L-ФГА	После активации КоНА
МПК до активации	63,3±7,1			
7-й день культивирования	64,1±6,2	66,3±4,4	66,7±4,3	65,3±6,3
14-й день культивирования	73,3±7,9	77,8±7,3	74,2±5,5	76,6±8,1
21-й день культивирования	87,4±6,2	80,4±6,7	82,7±7,8	81,3±8,2

3.2.3. Анализ иммунофенотипа первичной культуры лимфоцитов при длительном культивировании после стимуляции различными активаторами пролиферации

При изучении иммунофенотипа культивируемых МПК определяли долю CD3-CD56+НК-клеток, CD3+CD56+НКТ-клеток и CD3+CD56-Т-лимфоцитов, экспрессию NKG2D, NKp30, CD16, а также рассчитывали иммунорегуляторный индекс. К концу срока культивирования наибольшая доля CD3-CD56+НК-клеток была выявлена в пробах, активированных L-ФГА и КоНА (6,1±0,9% после активации L-ФГА и 5,7±0,7 после активации КоНА), в то время как МАТ и МАТ+FCS, по-видимому, стимулировали деление CD3+CD56+НКТ-клеток, максимальную долю которых регистрировали после активации МАТ+FCS и она

составляла $57,1 \pm 0,7\%$ (Рисунок 8, приложение Б.1). Преобладание в первичной культуре МПК CD3+CD56+НКТ-клеток к 21-му дню культивирования после предшествующей активации через Т-клеточный рецептор объясняется более медленной пролиферацией НКТ-клеток по сравнению с активированными Т-лимфоцитами. Именно поэтому многие протоколы для экспансии НК- и НКТ-клеток с помощью МАТ включают режим длительного культивирования до 21 дня, в то время как для экспансии Т-лимфоцитов достаточно 7-14 дней.

Использование МАТ или комбинации МАТ+FCS приводило к более выраженной, в сравнении с активацией L-ФГА или КонаА, экспрессии активационного рецептора NKG2D на поверхности как CD3+, так и CD56+лимфоцитов (процент NKG2D+клеток на 21-й день после активации МАТ составлял $82,7 \pm 8,3$, а после активации МАТ+FCS – $84,3 \pm 7,9$) (Приложение Б.1). Самая низкая доля NKG2D+клеток по сравнению с другими режимами активации ($50,1 \pm 5,9\%$) была определена после активации КонаА и связана, по-видимому, с небольшим процентным числом CD3+ или CD56+клеток-эффекторов в культуре МПК. Доля CD56+NKG2D+лимфоцитов была наивысшей при стимуляции МАТ ($50,8 \pm 5,5\%$) (Рисунок 8).

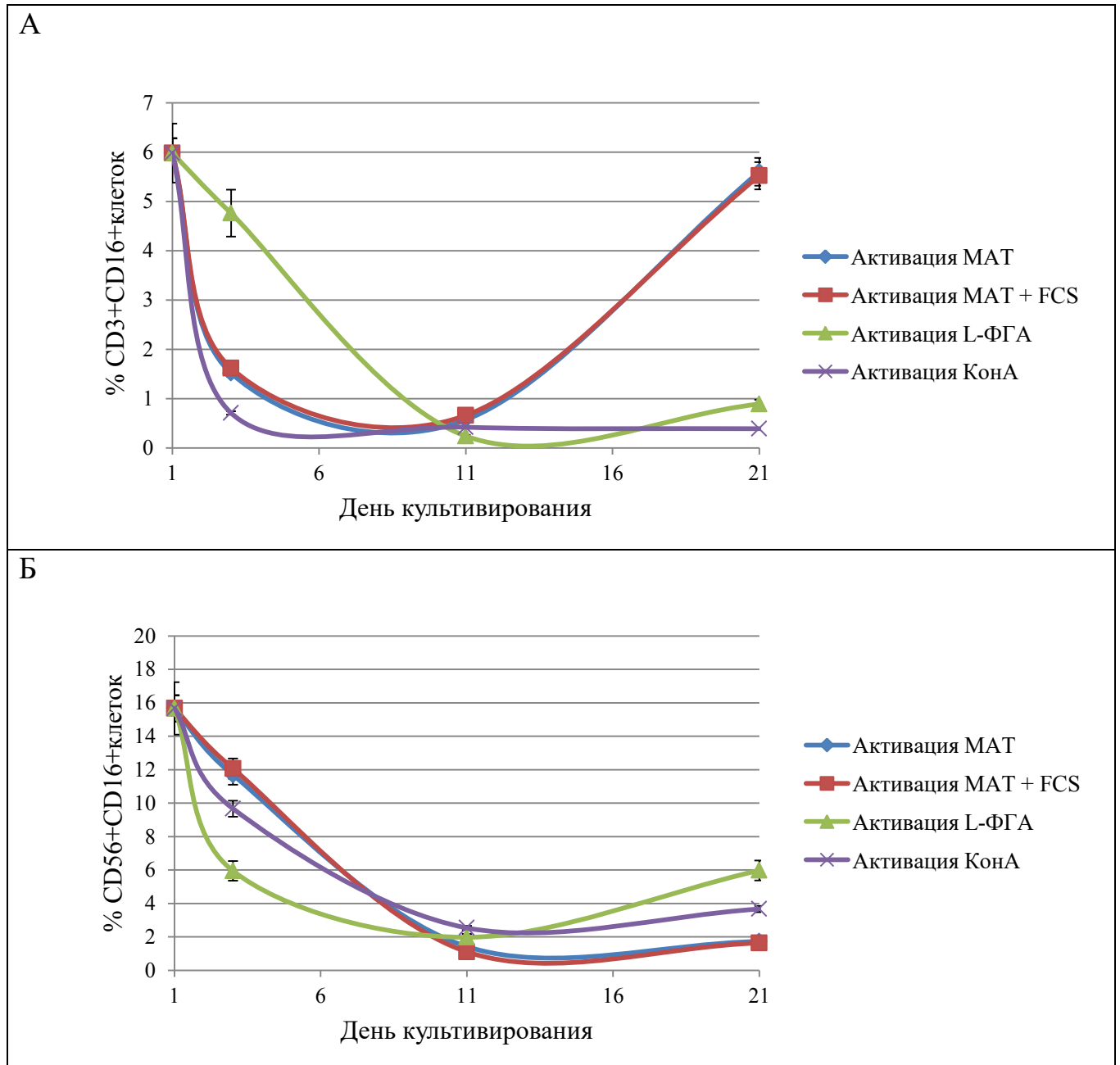


Примечания: А – доля CD3-CD56+клеток; Б – доля CD3+CD56+клеток; В – доля CD56+NKG2D+клеток

Рисунок 8 – Экспрессия маркеров НК-, НКТ-клеток, а также активационного рецептора NKG2D в динамике культивирования при различных способах активации

На следующем этапе мы определяли долю клеток, экспрессирующих CD16. Экспрессия эндогенного CD16 являлась одним из критериев сравнения активаторов, поскольку далее в данной работе в качестве CAR-рецептора использовали «универсальный» CAR, сконструированный на основе CD16-рецептора.

Следует отметить интересную особенность распределения CD16-рецептора на поверхности клеток различных популяций: к концу срока культивирования при первоначальной активации МАТ или МАТ+FCS CD16-маркер экспрессировался, главным образом, на поверхности CD3+лимфоцитов (доля CD3+CD16+клеток после активации МАТ составляла $5,6 \pm 0,5\%$, после активации МАТ+FCS – $5,5 \pm 0,7\%$), в то время как при активации ФГА более высокая экспрессия CD16-маркера была выявлена на поверхности CD56+клеток (доля CD56+CD16+клеток равнялась $6,0 \pm 0,6$ (Рисунок 9, приложение Б.1). Увеличение относительного и абсолютного количества CD56+ и CD16+клеток при использовании L-ФГА было связано, с пролиферацией CD56+CD16+ популяции НК-клеток, обладающей выраженными цитотоксическими свойствами. Исходя из данных литературы, L-ФГА не только запускает Т-клеточное деление, но и стимулирует образование Т-клеток памяти [212].



Примечания: А – доля CD3+CD16+клеток; Б – доля CD56+CD16+клеток
 Рисунок 9 – Распределение CD16-маркера на CD3+ и CD56+клетках в динамике культивирования в зависимости от способа активации

Для того чтобы определить влияние активаторов на отдельные субпопуляции Т-клеток мы оценивали значение иммунорегуляторного индекса – соотношения CD3+CD4+лимфоцитов к CD3+CD8+лимфоцитам. К 21-му дню культивирования иммунорегуляторный индекс после активации МАТ+FCS был наименьшим и составлял 0,1 (Рисунок 10, приложение Б.1), хотя статистически достоверно и не отличался от индекса, определенного после активации с использованием МАТ. Наибольший иммунорегуляторный индекс наблюдали

после стимуляции КонаА (1,4). КонаА значительно стимулировал деление CD3+CD4+Т-лимфоцитов, что было ранее показано в публикации [211]. Вероятно, Т-хелперы активировали деление CD3+CD56+НКТ-клеток, количество которых возросло по сравнению с активацией L-ФГА, хотя нельзя исключать и прямого стимулирующего действия КонаА на популяцию CD3+CD56+НКТ-клеток.

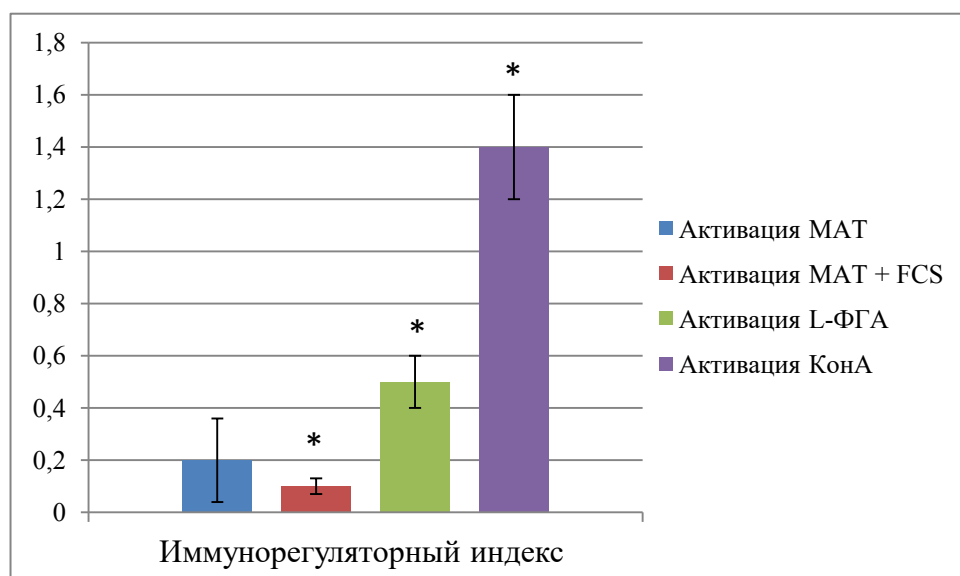


Рисунок 10 – Значение иммунорегуляторного индекса к 21-му дню культивирования в зависимости от способа активации, * $p < 0,05$

Исходя из приведенных данных, самым предпочтительным из представленных в данной работе способов активации клеток первичной культуры МПК является использование МАТ+ FCS, так как при данном режиме активации наблюдали наибольший прирост клеток, обладающих высокой цитотоксической активностью. Наиболее подходящим способом для экспансии смешанной популяции НК- и НКТ-клеток также является применение комбинации МАТ+FCS, поскольку при этом наблюдается максимальное абсолютное число CD56+клеток с высокой экспрессией активационного маркера NKG2D на их поверхности.

Результаты, изложенные в разделе 3.2, были опубликованы в [213].

3.3. Оптимизация методики использования клеточной линии НЕК 293Т в качестве фидерных клеток для экспансии НК- и НКТ-клеток

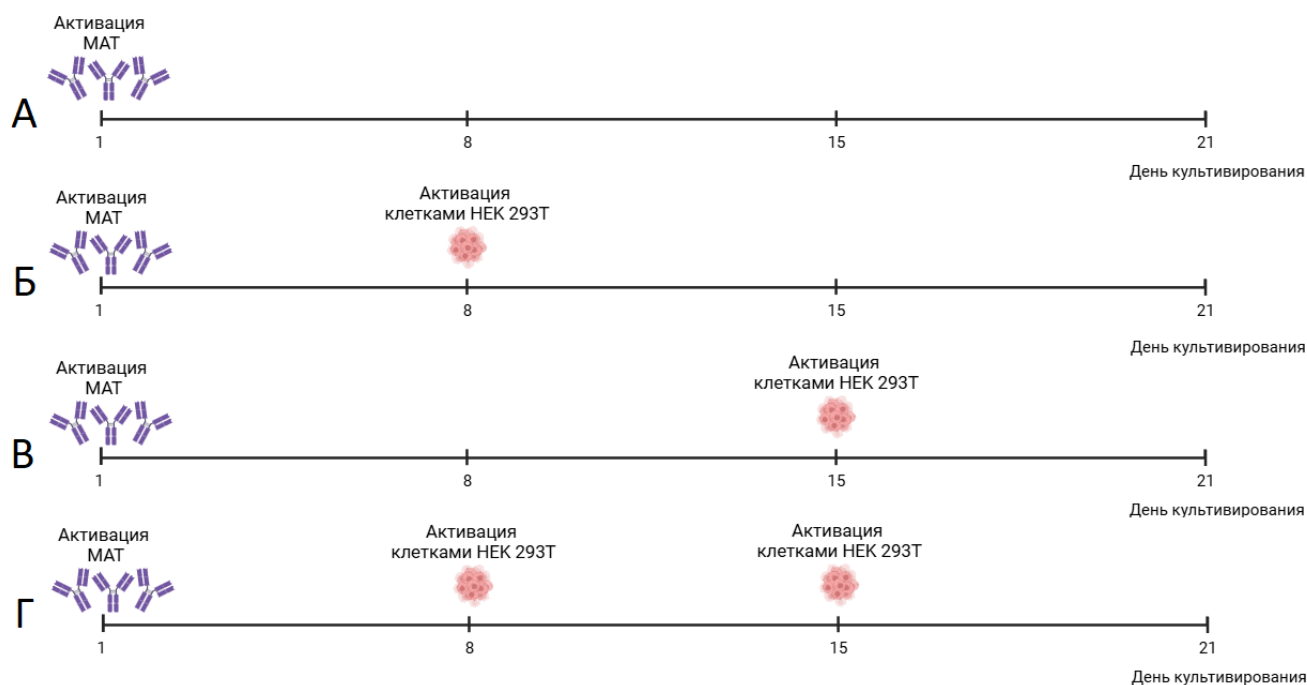
Согласно литературным данным, одним из самых эффективных способов экспансии НК-клеток является их соинкубация с фидерными клетками опухолевого происхождения [8]. Поэтому следующим направлением исследования являлось изучение влияния аллогенных фидерных клеток на пролиферацию НК- и НКТ-клеток в первичной культуре МПК при соинкубации. В качестве фидерных клеток была выбрана эмбриональная культура клеток почек человека НЕК 293Т. В качестве контроля мы использовали первичную культуру МПК, активированную с помощью МАТ к CD3-, CD28-рецепторам. Выбор группы сравнения был основан на результатах наших предыдущих исследований, показавших эффективность применения МАТ для пролиферации НКТ-клеток, а также ввиду того, что данный способ активации изложен во многих описанных в литературе протоколах для экспансии МПК.

В целях оптимизации протокола использования фидерных клеток мы применяли 2 различных подхода: методы активации, включающие активацию при помощи МАТ и НЕК 293Т и метод активации при помощи только фидерных клеток НЕК 293Т.

3.3.1. Методы активации первичной культуры лимфоцитов, включающие активацию МАТ и соинкубацию с НЕК 293Т

При активации МАТ + НЕК 293Т длительность культивирования составляла 21 день, активация с помощью МАТ проводили после выделения МПК, а соинкубация с НЕК 293Т – однократно на 8-й или 15-й день после активации при помощи МАТ или двукратно на 8-й и 15-й день (Рисунок 11). Эффективность применяемого метода активации МПК оценивали по доле клеток, экспрессирующих поверхностные маркеры активации, соотношению популяций лимфоцитов, а также по показателям цитотоксического теста, который проводили

на трех культурах-мишенях: на адгезионной культуре T47D-HER2+, суспензионной культуре HG3 (экспрессирующей CD20) и «классической» мишени для НК-клеток – суспензионной клеточной линии K562. При постановке цитотоксических тестов на культурах-мишенях T47D-HER2+ и HG3 использовали анти-HER2 МАТ (трастузумаб) или анти-CD20 МАТ (ритуксимаб) соответственно, что позволило оценить не только прямую цитотоксическую активность культивируемых МПК, но и их АЗКЦ. При проведении цитотоксических тестов путем соинкубации МПК с K562 определяли только прямую цитотоксическую активность культивируемых лимфоцитов.



Примечания: А – активация только с помощью МАТ в начале культивирования (контроль); Б – активация с помощью МАТ с последующей активацией культурой НЕК 293Т на 8-й день культивирования; В – активация с помощью МАТ с последующей активацией культурой НЕК 293Т на 15-й день культивирования; Г – активация с помощью МАТ с последующей активацией культурой НЕК 293Т на 8-й и 15-й день культивирования

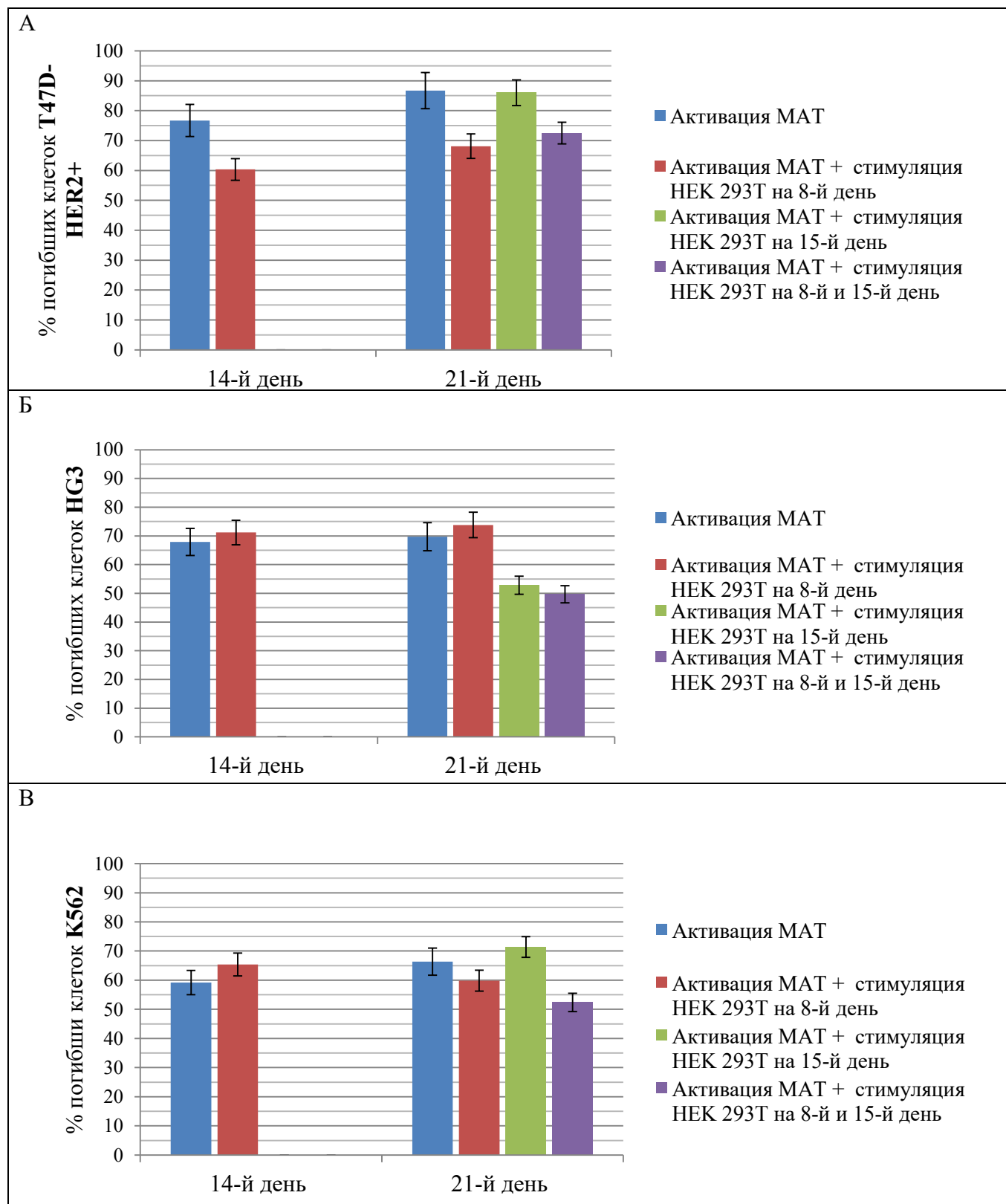
Рисунок 11 – Схема активации первичной культуры лимфоцитов с использованием МАТ к CD3-, CD28-рецепторам и фидерных клеток НЕК 293Т

Активация с помощью МАТ с последующей активацией культурой НЕК 293Т на 8-й день культивирования (Рисунок 11Б). На первом этапе экспериментов, проводимых с однократной стимуляцией культурой НЕК 293Т на 8-й день культивирования, на 14-й день культивирования было определено увеличение доли CD3-CD56+НК-клеток до $15,2 \pm 1,7\%$, CD56+CD16+ (смешанная популяция

НК- и НКТ-клеток, экспрессирующих CD16-рецептор) до $20,3 \pm 3,0\%$, CD56+CD4+ (НКТ-клетки) до $7,5 \pm 0,9\%$, CD56+NKp30+ (активированные НК- и НКТ-клетки) до $25,7 \pm 2,6\%$ по сравнению с клетками, активированными при помощи МАТ (Приложение В.1). Аналогичные показатели контрольной группы на 14-й день составили: доля CD3-CD56+НК-клеток – $6,9 \pm 0,8\%$, CD56+CD16+клеток – $7,8 \pm 1,4\%$, CD56+CD4+НК-клеток – $1,7 \pm 1,8\%$, CD56+NKp30+клеток – $17,7 \pm 1,9\%$.

При исследовании экспрессии поверхностных маркеров на 21-й день культивирования было выявлено снижение уровня экспрессии всех вышеупомянутых маркеров до уровней контрольной группы (клеток, активированных только с помощью МАТ), доля CD16+клеток также уменьшалась, однако их численность в процентном соотношении к концу срока культивирования оставалась выше, чем в контрольной группе. Мы предполагаем, что снижение экспрессии NKp30- и CD16-маркеров, а также уменьшение доли CD3-CD56+НК-клеток к 21-му дню культивирования в группе клеток, активированных МАТ + НЕК на 8-й день, связано с длительным отсутствием контакта МПК с фидерными клетками. Чтобы избежать уменьшения экспрессии, следует сокращать длительность культивирования первичной культуры МПК или использовать иные схемы активации.

При проведении цитотоксических тестов определяли прямую цитотоксичность лимфоцитов на культуре К562 и АЗКЦ на культурах Т47D-HER2+ и HG3, соотношение эффектор:мишень равнялось 5:1. МПК, стимулированные фидерными клетками, проявляли такую же цитотоксическую активность в отношении культур-мишеней HG3 и К562, как и клетки из контрольной группы (Рисунок 12).



Примечания: А – культура-мишень Т47D-HER2+; Б – культура-мишень HG3; В – культура-мишень K562

Рисунок 12 – Процент погибших клеток-мишеней в цитотоксическом тесте, проводимом на МПК, стимулированных МАТ и культурой НЕК 293Т

Активация с помощью МАТ с последующей активацией культурой НЕК 293Т на 15-й день культивирования (Рисунок 11В). Однократная соинкубация с фидерными клетками на 15-й день культивирования приводила к увеличению доли CD56+CD4+НКТ-клеток ($6,4 \pm 0,7\%$ от общей популяции МПК), CD56+CD16+клеток ($17,2 \pm 1,9\%$), CD56+NКp30+клеток ($25,0 \pm 2,7\%$) и иммунорегуляторного индекса ($1,8 \pm 0,3$) на 21-й день культивирования по сравнению с клетками контрольной группы. При активации с помощью МАТ доля CD56+CD4+НКТ-клеток равнялась $1,0 \pm 0,6\%$, доля CD56+CD16+клеток – $5,8 \pm 1,1\%$, доля CD56+NКp30+клеток – $6,8 \pm 0,8\%$, иммунорегуляторный индекс составлял $0,4 \pm 0,3$ (Приложение В.2). При данном подходе к активации не наблюдали существенного увеличения доли CD3-CD56+НК-клеток по сравнению с культурой, активированной только МАТ. Вероятно, это связано с ограниченным потенциалом деления двухнедельной зрелой культуры лимфоцитов, вследствие чего стимуляция пролиферации на 15-й день культивирования не приводит к выраженной экспансии НК-клеток.

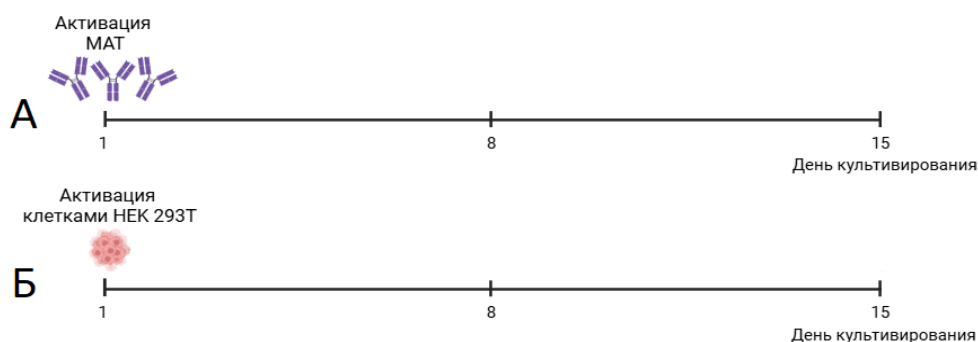
При активации МАТ с последующей активацией НЕК 293Т на 15-й день наблюдали снижение цитотоксической активности МПК при проведении цитотоксического теста на клетках-мишенях HG3, а различия в цитотоксической активности в отношении культур Т47D-HER2+ и K562 оказались статистически недостоверными по сравнению с контролем (Рисунок 12).

Активация с помощью МАТ с последующей активацией культурой НЕК 293Т на 8-й и 15-й день культивирования (Рисунок 11Г). В результате активации МАТ и двукратной стимуляции фидерными клетками было выявлено достоверное снижение цитотоксической активности в сравнении с контрольной группой (Рисунок 12). Однако, к концу срока культивирования при данном режиме активации наблюдали максимальную (в сравнении с контролем или подходами с использованием однократной соинкубации с НЕК 293Т) долю CD56+CD4+, CD56+NКp30+ и CD56+CD16+клеток (Приложение В.3). Доля CD56+CD4+клеток составила $49,6 \pm 5,8\%$, доля CD56+NКp30+клеток – $57,1 \pm 5,9\%$, а доля CD56+CD16+клеток – $54,7 \pm 5,7\%$. Возможно, повторный контакт

с клетками-мишенями вызывал активацию и пролиферацию НЕК 293Т-специфичных НКТ- и НК-клеток памяти, субпопуляция которых, по-видимому, образовалась после первого контакта с фидерами [208]. При повторной активации лимфоцитов наблюдали существенное увеличение CD56+клеток, экспрессирующих CD4+корцептор, что, возможно, указывает на наличие в культуре лимфоцитов НКТ-клеток памяти, экспрессирующих данную корцепторную молекулу [209].

3.3.2. Активация лимфоцитов клеточной линией НЕК 293Т в начале культивирования

Принципиально иным подходом к активации и обогащению популяции НК-клеток являлась стимуляция неактивированных МПК клетками НЕК 293Т без использования МАТ (Рисунок 13). В качестве контроля использовали МПК, активированные МАТ, культивирование проводили в присутствии ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-21 в течение 14 дней. При всех вариантах активации в ростовую среду для МПК добавляли ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-21. Оценку активации МПК с использованием только фидерных клеток проводили учитывая экспрессию поверхностных маркеров активации на 4-14 сутки после активации, соотношение популяций МПК в культуре, а также цитотоксическую активность клеток в отношении культур-мишеней T47D-HER2+, HG3 и K562.



Примечания: А – активация только с помощью МАТ в начале культивирования (контроль);

Б – активация только клеточной линией НЕК 293Т в начале культивирования

Рисунок 13 – Схема активации первичной культуры лимфоцитов с использованием МАТ к CD3-, CD28-рецепторам или фидерных клеток НЕК 293Т

Поскольку в условиях стимуляции пролиферации без использования МАТ отсутствовала активация Т-клеточного рецептора, это приводило к ограниченной экспансии Т- и НКТ-клеток, что отражалось на невысоком, по сравнению с контролем, приросте общего числа клеток первичной культуры лимфоцитов (Таблица 7).

Таблица 7 – Абсолютное число МПК на 14-й день культивирования в зависимости от способа активации, $p < 0,05$

Показатель	МПК до активации	Активация МАТ	Активация НЕК 293Т
Общее количество клеток, $\cdot 10^6$	1	59 ± 6	$3,5 \pm 1$

Тем не менее, данный режим активации лимфоцитов оказался самым эффективным для экспансии популяции НК-клеток: уже на 4-й день культивирования доля CD3-CD56+НК-клеток составляла $43,3 \pm 4,4\%$, а доля CD3+CD56+НКТ-клеток – $17,1 \pm 1,9\%$ (Приложение В.4).

Далее мы проанализировали распределение маркеров ранней активации в первичной культуре МПК. В качестве маркеров мы использовали CD38 (трансмембранный гликопротеин, экспрессирующийся на активированных иммунных клетках), CD69 (самый ранний маркер пролиферации лимфоцитов) и CD25 (высокоаффинный рецептор ИЛ-2, обеспечивающий опосредование пролиферации Т-клеток). Было выявлено увеличение экспрессии данных рецепторов на поверхности CD56+клеток в сравнении с контролем, что указывает на активацию CD56+популяции НК- и НКТ-клеток после контакта с НЕК 293Т (Таблица 8).

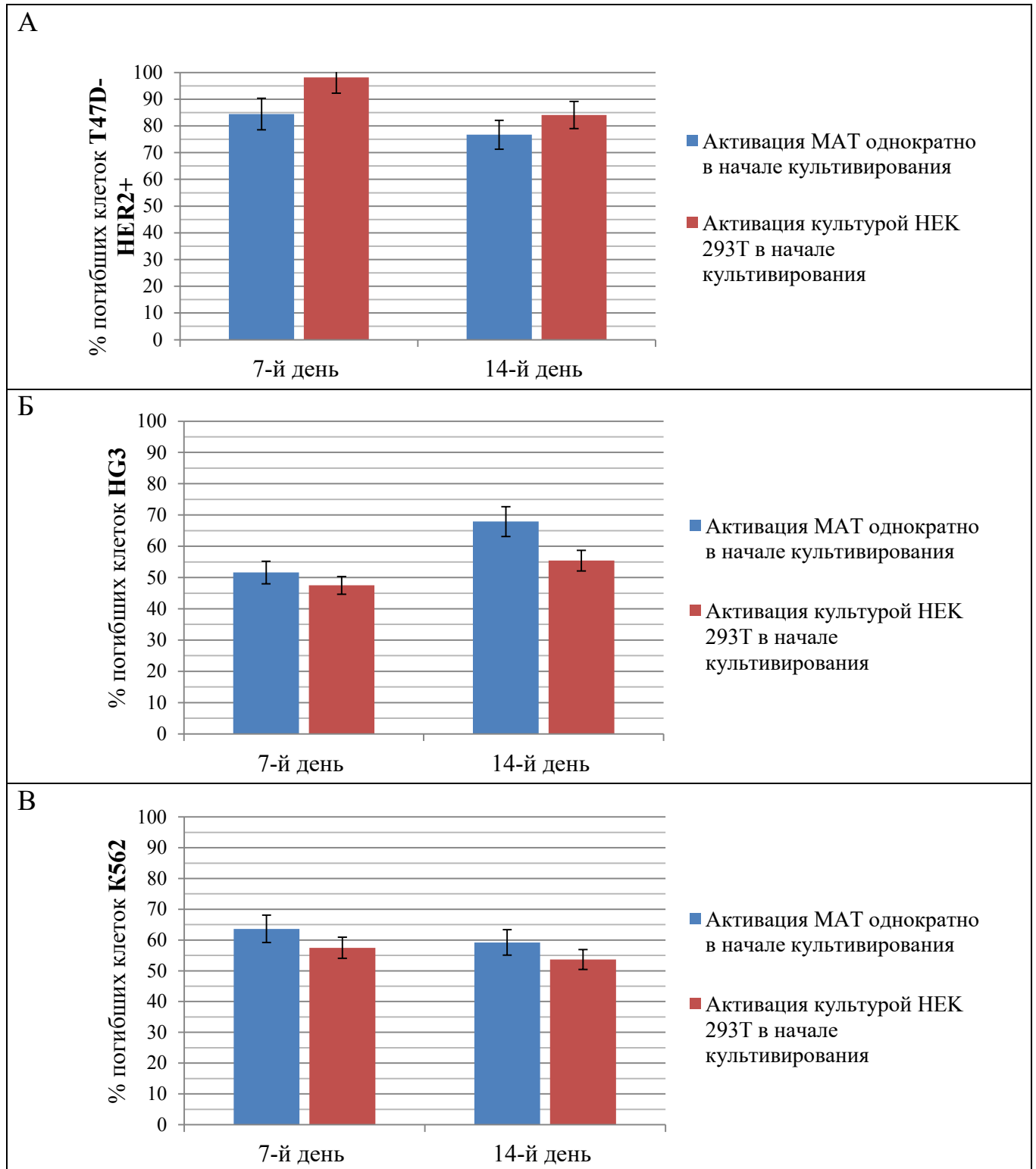
Таблица 8 – Экспрессия ранних маркеров активации на 4-й день после стимуляции МПК клеточной линией НЕК 293Т, проводимой в начале культивирования

Показатель	Активация МАТ однократно в начале культивирования	Активация НЕК 293Т однократно в начале культивирования
Доля CD38+ клеток, %	$83,2 \pm 8,4$	$58,3 \pm 6,1$
Доля CD56+CD38+ клеток, %	$17,1 \pm 1,9$	$36,7 \pm 3,8$
Доля CD69+ клеток, %	$86,4 \pm 8,6$	$27,1 \pm 2,8$
Доля CD56+CD69+ клеток, %	$17,3 \pm 1,8$	$22,1 \pm 2,2$
Доля CD25+ клеток, %	$64,6 \pm 6,6$	$24,9 \pm 2,6$
Доля CD56+CD25+ клеток, %	$6,1 \pm 0,8$	$23,7 \pm 2,6$

При оценке динамики экспрессии поверхностных маркеров и соотношения популяций клеток в период с 4-го по 14-й день культивирования после активации фидерами НЕК 293Т отмечали постепенное уменьшение доли: CD3-CD56+НК-клеток до $29,2 \pm 3,1\%$, CD56+CD8+цитотоксических НКТ-клеток до $6,3 \pm 0,8\%$, а также возрастание доли CD3+CD56+НКТ-клеток до $45,8 \pm 4,8\%$ и CD56+CD4+НКТ-клеток до $57,8 \pm 5,9\%$ (Приложение В.4). Несмотря на снижение доли CD3-CD56+НК-клеток их содержание в первичной культуре МПК, стимулированной однократно фидерными клетками НЕК 293Т (Рисунок 12), к концу срока культивирования составляло $29,2 \pm 3,1\%$, в то время как доля CD3-CD56+НК-клеток к концу срока культивирования после активации с помощью МАТ равнялась $6,0 \pm 0,8\%$.

При сравнении с культурой, активированной при помощи МАТ, после активации фидерными клетками среди CD56+клеток с 4-го до 14-й день культивирования возрастала доля NKG2D+ (распознающий опухолевые клетки рецептор, экспрессирующийся на Т-, НК- и НКТ-клетках), NKp30+ (активирующий рецептор НК-клеток) и CD16+клеток (рецептора для IgG) (Таблица В.4). Увеличение доли CD56+клеток, экспрессирующих NKp30- и CD16-маркер, связано с пролиферацией активированной популяции CD3+CD56+НКТ-клеток. Вследствие деления данных клеток увеличивается доля НКТ-клеток, что пропорционально влияет на снижение доли НК-клеток.

Культура МПК, активированная только с помощью клеток НЕК 293Т, проявляла повышенную цитотоксичность в отношении адгезионной клеточной линии T47D-HER2+ на 7-й день культивирования, цитотоксическая активность в отношении других культур-мишеней оказалась незначительно ниже по сравнению с клетками контрольной группы (Рисунок 14).



Примечания: А – культура-мишень T47D-HER2+; Б – культура-мишень HG3; В – культура-мишень K562

Рисунок 14 – Процент погибших клеток-мишеней в цитотоксическом тесте, проводимом на МПК, стимулированных культурой НЕК 293Т

Однократная активация клеточной линией НЕК 293Т без использования МАТ является наиболее предпочтительным протоколом для экспансии НК- и НКТ-клеток среди рассматриваемых в данной работе, позволяющим увеличить содержание CD56⁺лимфоцитов с 23% до 60% в первичной культуре лимфоцитов на 4-й день после активации. Активация без стимуляции Т-клеточного рецептора, с одной стороны, приводит к эффективному обогащению популяции НК-клеток, но, с другой стороны, при этом происходит ограниченная экспансия НКТ- и Т-клеток, что сказывается на относительно невысоком общем числе клеток, получаемых после культивирования.

Поскольку средняя продолжительность жизни НК-клеток составляет две недели, культивирование первичной культуры МПК при данном режиме активации составляло не более 14 дней. В целях совершенствования данного протокола для экспансии НК- и НКТ-клеток предлагается дальнейшее сокращение срока культивирования ввиду естественной ограниченной экспансии популяции НК-клеток.

При использовании НЕК 293Т в качестве фидерных клеток наблюдали выраженное возрастание доли НК- и НКТ-клеток. Вероятно, экспансия НК- и НКТ-клеток происходила не только в результате прямого межклеточного контакта с фидерными клетками, но и с помощью цитокинов, секретиремых Т-хелперами: при некоторых режимах культивирования отмечали существенное возрастание доли CD4⁺клеток, а они, как известно, способны стимулировать экспансию НК-клеток [214]. Результаты исследований показывают, что Т-клеточный антиген SV40, экспрессируемый клетками НЕК 293Т, стимулирует Т-хелперы [215].

Отсутствие изменения цитотоксической активности культуры МПК в сравнении с контролем в ответ на стимуляцию фидерными клетками может быть объяснено специфическим выбором группы сравнения: активация МАТ приводит к выраженной пролиферации CD3⁺CD8⁺лимфоцитов, которые сами по себе обладают высокой цитотоксической активностью. Тем не менее, выбор в качестве контроля активации с помощью МАТ, по нашему мнению, вполне оправдан,

поскольку позволяет соотносить экспериментальные результаты с актуальным и наиболее распространенным протоколом для экспансии клеток в рамках технологии создания CAR-лимфоцитов. Выявление снижения цитотоксической активности анализируемой первичной культуры МПК, вероятно, коррелирует с прямым угнетающим воздействием клеток линии НЕК 293Т. Т-клеточный антиген SV40 способен ингибировать продукцию ИФН γ , инактивировать белок p53, а также вызывать истощение Т-лимфоцитов [216].

Изменение цитотоксической активности одной и той же культуры МПК в отношении различных клеток-мишеней в сравнении с клетками, активированными только с помощью МАТ, возможно, связано с характеристиками клеток-мишеней, а также условиями постановки цитотоксического теста и требует дальнейшего изучения. T47D-HER2+ представляет собой адгезионную культуру, при выборе данной мишени проводили исследование общей цитотоксической активности (как прямой цитотоксичности, так и АЗКЦ) путем добавления трастузумаба – препарата, содержащего анти-HER2 антитела. При работе с клетками HG3 также изучали общую цитотоксичность, добавляя ритуксимаб (анти-CD20 антитела), однако культура в данном случае является суспензионной. K562 также представляют собой суспензионную клеточную линию, но при проведении цитотоксического теста с K562 добавления специфических антител не проводили.

Преимущество использования клеточной линии НЕК 293Т для стимуляции МПК заключается в простоте проведения генетических манипуляций с данной культурой [199]. Например, экспрессия опухоль-ассоциированных антигенов, связанных с мембраной цитокинов и/или иных активирующих молекул сможет улучшить распознавание антигенов, выживаемость, пролиферацию и цитотоксичность клеток иммунной системы. Аналогично модификация фидерных клеток K562 с целью экспрессии ИЛ-21 и 4-1BBL привела к увеличению количества НК-клеток в 20 раз по сравнению с контролем, где после активации немодифицированной культурой K562 наблюдали прирост численности НК-клеток в 2,5 раза [8]. Для более полной оценки потенциала культуры

НЕК 293Т в качестве фидерных клеток также необходим сравнительный анализ данной клеточной линии с более «традиционными» активаторами деления НК-клеток: K562, Jurkat, EBV-TM-LCL.

Результаты, изложенные в разделе 3.3, были опубликованы в [217].

3.4. Подбор условий для осуществления эффективной лентивирусной трансдукции с целью получения CAR-лимфоцитов

Помимо экспансии лимфоцитов одним из основных направлений разработки протокола для получения CAR-клеток является их генетическая модификация, осуществляемая для экспрессии CAR на поверхности лимфоцитов. В данном исследовании проводили оптимизацию получения лентивируса, несущего гены CAR, а также подбирали условия для эффективного встраивания CAR трансгена в лимфоциты. Мы получали смешанную популяцию CAR-лимфоцитов, не уделяя особого внимания трансдукции НК- или НКТ-клеток в отдельности. В качестве внеклеточного антигенраспознающего фрагмента CAR выступал активирующий Fc-рецептор CD16. Наряду с этим использовали лентивирус, в векторе которого вместо генов CAR была закодирована последовательность флуоресцентного белка GFP.

При сборке вирусных частиц использовали плазмиды:

- pLenti-PGK-GFP (L-GFP). В данной плазмиде закодирована генетическая информация о репортерном флуоресцентном белке GFP. Также плазида содержит ген устойчивости к антибиотику бластицидину, репортерный ген находится под контролем промотора PGK.
- pLenti-PGK-CD16-CAR (L-CAR), в которой генетическая последовательность CD16-CAR была клонирована вместо GFP в pLenti-PGK-GFP, плазида также содержит ген устойчивости к бластицидину.
- pCMV-VSV-G. Это вспомогательная плазида для сборки лентивирусной частицы, она кодирует последовательность белка оболочки вируса.
- pCMV-ΔR8.2 также является вспомогательной плазмидой, используемой для упаковки лентивирусов.

Сборку лентивирусных частиц проводили путем трансфекции клеток НЕК 293Т с использованием плазмид L-GFP + pCMV-VSV-G + pCMV-ΔR8.2 или L-CAR + pCMV-VSV-G + pCMV-ΔR8.2. Генетическую модификацию лимфоцитов проводили посредством трансдукции с использованием полученного лентивируса.

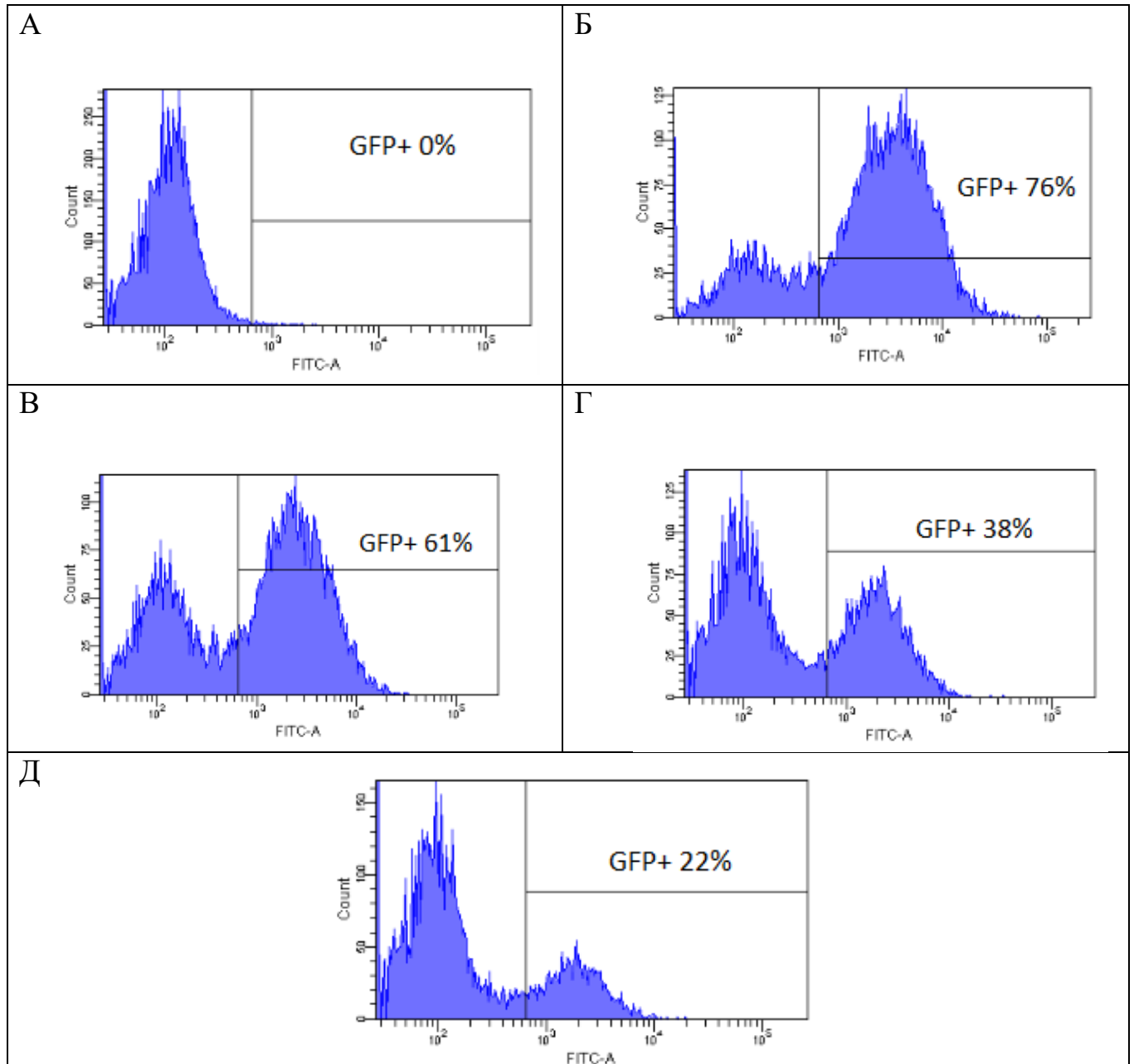
3.4.1. Сравнение протоколов для трансфекции клеток НЕК 293Т и методик по концентрированию лентивирусов

В работе проводили сравнение двух протоколов трансфекции, в которых в качестве доставщика генетического материала использовали липофектамин или кальций-фосфат. Оценку эффективности метода проводили по уровню экспрессии флуоресцентного белка GFP в клетках НЕК 293Т. Было показано, что при использовании липофектамина доля GFP+ клеток НЕК 293Т после трансфекции составляла $82 \pm 7\%$, а при применении кальций-фосфата – $64 \pm 8\%$. Поэтому в дальнейших экспериментах вирусосодержащий материал получали путем трансфекции с применением липофектамина. Наш выбор в пользу липофектамина и его преимущество в сравнении с использованием кальций-фосфата при трансфекции подтверждается опубликованными ранее данными [218].

Кроме того, было необходимо определить титр вируса и проверить функциональность вируса после заморозки. Для этого проводили трансдукцию клеток НЕК 293Т с неконцентрированным размороженным вирусом, взятым в различных объемах от 60 до 500 мкл. Титр вируса до заморозки составлял $2,2 \times 10^5$ IU/мл. Полученные данные представлены в Таблице 9 и на Рисунке 15.

Таблица 9 – Экспрессия GFP в трансдуцированных клетках НЕК 293Т через 72 ч после трансдукции

Параметр	Доля GFP+клеток, %
Нетрансдуцированный контроль	0
Добавление 500 мкл вирусосодержащего материала (VCM)	76 ± 7
Добавление 250 мкл VCM	61 ± 8
Добавление 125 мкл VCM	38 ± 5
Добавление 60 мкл VCM	22 ± 7



Примечания: А – нетрансдуцированный контроль; Б – добавление 500 мкл ВСМ; В – добавление 250 мкл ВСМ; Г – добавление 125 мкл ВСМ; Д – добавление 60 мкл ВСМ. Данные репрезентативного эксперимента

Рисунок 15 – Экспрессия GFP в трансдуцированных клетках HEK 293T через 72 ч после трансдукции

Как видно из Таблицы 9, при добавлении 60 мкл ВСМ эффективность трансдукции через 72 ч после постановки составила $22 \pm 7\%$, что указывает на то, что на одну клетку приходилось не более одной вирусной частицы. Исходя из этого предположения, был определен титр вируса при объеме вирусосодержащей среды 60 мкл по следующей формуле:

$$\text{Титр вируса} = N \times \text{GFP+} / V \quad (4)$$

где:

Титр вируса – показатель концентрации вирусных частиц в единице объема, IU/мл;

N – количество клеток НЕК 293Т, взятых для трансдукции, в 1 мл питательной среды;

GFP+ – доля GFP+клеток НЕК 293Т после трансдукции;

V – объем вирусосодержащей среды, мл.

Титр вируса после разморозки составил $7,3 \pm 2,3 \times 10^4$ IU/мл. Так как титр вируса до заморозки составлял $2,2 \times 10^5$ IU/мл, было установлено, что после разморозки количество функциональных частиц вируса уменьшается в 2,3-4,4 раза.

После проведения трансфекции клеток НЕК 293Т плазмидой L-GFP и вспомогательными плазмидами pCMV-VSV-G и pCMV-ΔR8.2, необходимыми для сборки лентивирусных частиц, переходили к этапу концентрирования вирусосодержащего материала. Прежде всего, мы решили оценить эффективность концентрирования с помощью двух различных способов: путем добавления 25%-ного PEG8000 или использования полибрена. После концентрирования были получены 10-кратные вирусные концентраты, которые затем использовали для трансдукции клеток линии НЕК 293Т. В качестве контроля брали неконцентрированный вирус, полученный путем трансфекции одновременно с вирусным концентратом. После трансдукции доля GFP+клеток была существенно выше при использовании вирусных концентратов (Таблица 10). Также при использовании концентрированного вируса наблюдали более высокую степень флуоресценции GFP, что свидетельствует о том, что при использовании 10-кратной концентрации вируса на одну клетку НЕК 293Т приходилось более одной вирусной частицы.

Таблица 10 – Оценка эффективности концентрирования ВСМ

	Неконцентрированный вирус	Концентрат, использование PEG8000	Концентрат, использование полибрена
Доля GFP+клеток НЕК 293Т	54±6	79±6	74±9
Потеря функциональных частиц после концентрирования, %		< 50	< 20

Также мы анализировали потерю вирусных частиц при концентрировании лентивируса, содержащего ген GFP-белка, определяемую путем сравнения титра вируса до и после процесса концентрирования (Таблица 10). После 10-кратного концентрирования с использованием полибрена потери функциональных вирусных частиц доходили до 20% по сравнению с неконцентрированной вирусосодержащей средой. Аналогичное концентрирование с PEG8000 приводило к потере до 50% функциональных вирусных частиц.

Оценку методики концентрирования вирусосодержащего материала проводили также при трансдукции клеток из фракции активированных CD4+, CD8+ лимфоцитов, полученных из первичной культуры МПК. В данных экспериментах лентивирусная конструкция включала плазмиду L-CAR вместо L-GFP. Экспрессия CAR-рецептора после концентрирования с помощью полибрена составила 31±5%, а после концентрирования с PEG8000 – 41±6% (Таблица 11). Полибрен оказался более токсичным для лимфоцитов: на 4-й день после трансдукции с полибреном количество клеток при использовании полибрена возрастало в 9±1 раз, а их жизнеспособность была 53±8%; при использовании PEG8000 количество клеток на 4-й день после трансдукции увеличивалось в 13±2 раз при жизнеспособности 72±7%. Исходя из полученных данных о токсичности полибрена, в дальнейших экспериментах для концентрирования лентивирусов использовали PEG8000.

Таблица 11 – Сравнение методов концентрирования ВСМ путем проведения трансдукции CD4+, CD8+ лимфоцитов

	Использование PEG8000	Использование полибрена
Экспрессия CAR-рецептора, % клеток	41±6	31±5
Прирост клеток после трансдукции, раз	13±2	9±1
Жизнеспособность клеток на 3-й день после трансдукции, %	72±7	53±8

Концентрирование вирусосодержащего материала является неотъемлемой частью многих протоколов для получения лентивирусного вектора, оно позволяет увеличивать титр вируса и множественность инфекции [219]. Из рассматриваемых в данной работе способов концентрирования вирусосодержащего материала наиболее оптимальным протоколом является концентрирование с применением 25%-ного PEG8000, поскольку концентрирование с полибреном с последующей трансдукцией (также проводимой с полибреном) снижает жизнеспособность клеток первичной культуры МПК.

3.4.2. Оценка эффективности лентивирусной трансдукции клеточной линии Jurkat и первичной культуры МПК

После подбора оптимальных условий для сборки и концентрирования лентивирусов проводили оценку эффективности лентивирусной трансдукции на культуре клеток Jurkat. Jurkat – это клетки, происходящие из злокачественно трансформированного клона Т-хелперов и используемые в качестве модели для оценки эффективности лентивирусной трансдукции при получении CAR-лимфоцитов [220]. На клетках Jurkat проводили трансдукцию с добавлением полибрена – катионного полимера, облегчающего контакт вириона с клеткой-мишенью. В качестве вирусосодержащего материала использовали 10-кратный концентрат лентивирусов, полученный при концентрировании с PEG8000, и неконцентрированный вирус. Лентивирусные частицы содержали генетическую

последовательность флуоресцентного белка GFP. Трансдукция с вирусным концентратом привела к экспрессии GFP в $86,2 \pm 15,2\%$ клеток на 3-й день после трансдукции, тогда как при использовании неконцентрированного вируса GFP экспрессировался только в $14 \pm 6\%$ клеток. Тем не менее, при использовании данного концентрата через 48 ч после трансдукции наблюдали снижение жизнеспособности клеток Jurkat с 86% до 43%. Предполагается, что переизбыток вирусных частиц в концентрате привел к токсичности данного вирусосодержащего материала, что в свою очередь вызвало снижение жизнеспособности трансдуцируемых клеток [221].

С целью повышения частоты встраивания CAR генов в геном клеток первичной культуры МПК было предложено несколько подходов. В первую очередь мы исследовали действие различных активаторов пролиферации клеток на эффективность последующей трансдукции, так как для успешного проникновения лентивирусного вектора клетка должна быть активирована [222]. Мы проводили активацию клеток первичной культуры МПК с помощью МАТ, МАТ+FCS, L-ФГА или КонА без разделения клеточных популяций, а также активацию сепарированной смешанной фракции CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов с использованием биodeградируемых наночастиц железа-декстрана, конъюгированных с МАТ к CD3-, CD28-рецепторам. Так как согласно нашим исследованиям самым эффективным из представленных в данной работе способом обогащения популяции НК-клеток является однократная соинкубация МПК с фидерными клетками НЕК 293Т в начале культивирования, мы также исследовали эффективность трансдукции после активации первичной культуры МПК с помощью НЕК 293Т (Рисунок 13Б). В данной серии экспериментов по трансдукции использовали 10-кратно сконцентрированные препараты лентивирусов, несущих последовательности GFP или CD16-CAR, трансдукцию проводили с добавлением катионного полимера полибрена. Оценку экспрессии GFP или CD16-CAR проводили на 6-й или 7-й день после трансдукции. Как видно из Таблицы 12, при активации МПК без разделения популяций процент клеток, экспрессирующих CD16-рецептор составлял от $12,4 \pm 3,1\%$ до $16,5 \pm 3,4\%$.

Трансдукция клеток после активации НЕК 293Т оказалась крайне низкой, что может быть объяснено естественной устойчивостью обогащенной популяции НК-клеток к генетическим модификациям [222].

Таблица 12 – Определение экспрессии CD16-рецептора на 5-й день после постановки трансдукции

Способ активации клеток	Доля CD16+клеток, %
Культура клеток Jurkat, без активации (трансдуцированный контроль)	86,2±15,2
Первичная культура МПК без разделения клеточных популяций	
МАТ	16,5±3,4
МАТ + FCS	16,1±4,3
L-ФГА	15,7±4,2
Кона	12,4±3,1
Однократная соинкубация с НЕК 293Т в начале культивирования	1,1±0,5
Фракция CD4+, CD8+лимфоцитов	
Наночастицы железа-декстрана, конъюгированные с МАТ	56,1±10,5

Экспрессия GFP после активации с помощью МАТ, МАТ+FCS, L-ФГА или Кона варьировала от 9,2±3,6% до 21,1±5,4% не зависимо от выбранного активатора. Также мы оценили распределение CAR-рецептора среди популяций лимфоцитов: было установлено достоверное увеличение доли CD3+CAR-лимфоцитов (на 3-5%) в сравнении с долей CD56+CAR-клеток при режимах активации с использованием МАТ, МАТ+FCS, L-ФГА или Кона. Было отмечено, что доля CAR+ или GFP+клеток после трансдукции первичной культуры МПК всегда была ниже, чем доля аналогичных клеток Jurkat при одинаковых условиях получения вируса.

Более низкая эффективность трансдукции первичной культуры лимфоцитов по сравнению с трансдукцией клеточной линии Jurkat, вероятно, может быть

объяснена большим количеством паттерн-распознающих рецепторов, в данном случае противовирусных, на поверхности лимфоцитов и в их цитоплазме, которые способны нейтрализовать вирусные частицы [223]. Возможно также, что невысокая экспрессия CAR связана с апоптозом МПК при контакте с вирусом или обусловлена токсичностью вирусного концентрата.

Другим экспериментальным подходом для получения CAR-лимфоцитов являлось проведение магнитной сепарации с целью получения отдельных фракций CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов с их последующей активацией путем соинкубации с биodeградируемыми наночастицами, состоящими из наночастиц железа-декстрана, конъюгированных с МАТ к CD3-, CD28-рецепторам. Свежевыделенные МПК сепарировали, активировали полученную фракцию CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов и проводили трансдукцию через 2 дня после активации. С помощью такого подхода удалось добиться повышения уровня экспрессии CD16-рецептора до $56,1 \pm 10,5\%$ (Таблица 12, Рисунок 16).

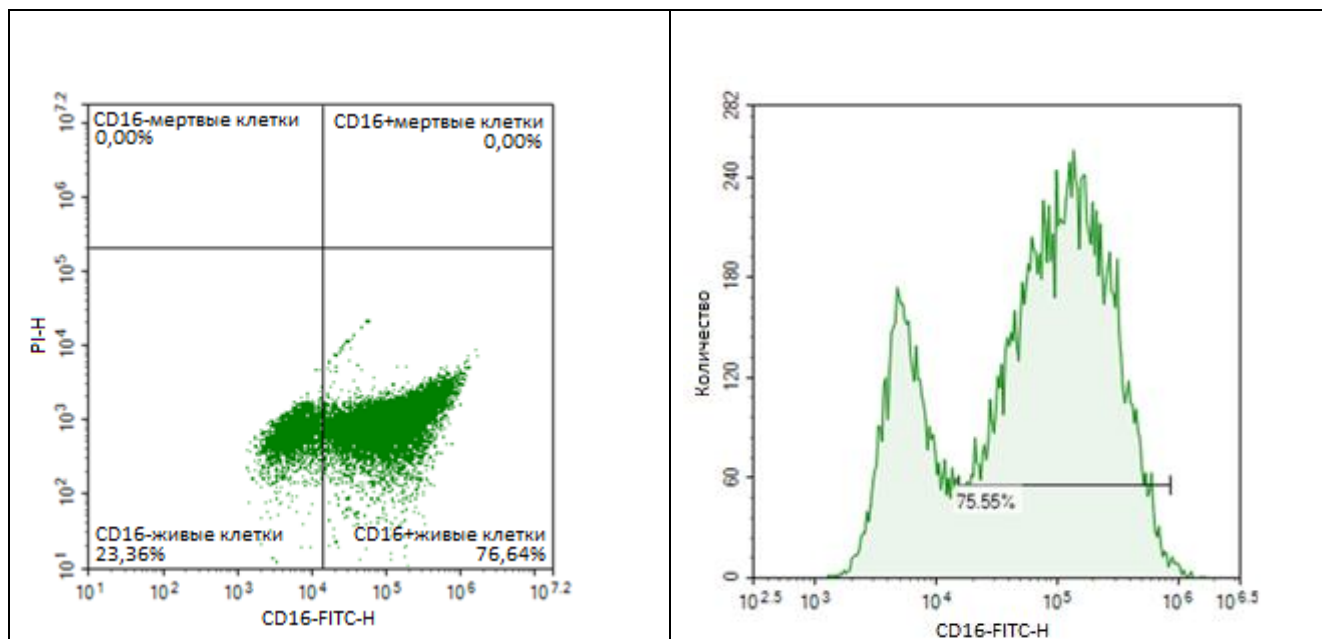


Рисунок 16 – Экспрессия CD16-CAR-рецептора на клетках МПК после трансдукции. Данные репрезентативного эксперимента

Поскольку при трансдукции вирусная частица взаимодействует с какой-либо клеткой случайным образом, то адгезия или проникновение вируса в клетку, принадлежащую к определенной клеточной популяции, определяется только частотой встречаемости клетки данной популяции среди всех клеток первичной

культуры. Так вирус инфицирует клетки популяций, которые слабо подвержены трансдукции, например, НК-клетки и Treg. Известно, что НК-клетки обладают способностью к ограничению внутриклеточной активности вируса [224]. Treg характеризуются слабой пролиферацией в ответ на этап активации, что снижает эффективность встраивания CAR-трансгена [225]. Поэтому с целью повышения эффективности трансдукции предлагается предварительное разделение клеточных популяций, позволяющее не расходовать вирус на трансдукцию нетрансдуцируемых клеток при условии, что данные популяции не являются целевыми. Практическое обоснование данного предположения было показано в данном исследовании, позволив существенно увеличить долю CAR-лимфоцитов при использовании предварительной магнитной сепарации. По данным исследований, применение клеточной сепарации имеет и другие положительные эффекты: запускается процесс дополнительной активации лимфоцитов, а такое состояние клетки является крайне важным для успешной генетической модификации [226].

Так как процент CAR-лимфоцитов после трансдукции первичной культуры без разделения популяций был недостаточно высоким при любых используемых способах активации, было предложено проведение селекции CAR-клеток, имеющих ген устойчивости к бластицидину, который был закодирован в лентивирусном векторе. Так к клеткам первичной культуры МПК, активированным при помощи МАТ, добавляли в питательную среду антибиотик бластицидин с 7-го дня после активации и до окончания культивирования. Это позволило добиться эффективного обогащения популяции CAR-лимфоцитов: к концу срока культивирования доля CAR-лимфоцитов составляла $88,5 \pm 7,4\%$ всей клеточной популяции (Таблица 13).

Таблица 13 – Экспрессия CD16-рецепторов к 21-му дню культивирования после селекции с использованием бластицидина, $p < 0,05$

Наличие/отсутствие селекции	Доля лимфоцитов, %
Доля CD16+лимфоцитов сразу после трансдукции	$13,2 \pm 4,3$
Доля CD16+лимфоцитов без селекции	$2,2 \pm 1,7$
Доля CD16+лимфоцитов после селекции	$88,5 \pm 7,4$
Доля CD3-CD56+CD16+лимфоцитов после селекции	$2,4 \pm 1,3$

Продолжение Таблицы 13

Наличие/отсутствие селекции	Доля лимфоцитов, %
Доля CD3+CD56+CD16+лимфоцитов после селекции	45,4±6,4
Доля CD3+CD56-CD16+лимфоцитов после селекции	40,8±7,7

Таким образом, повышение доли CAR-лимфоцитов в культуре возможно и в период после трансдукции. В данной работе с успехом применяли селекцию CAR-лимфоцитов бластицидином, при которой не только выживают клетки со стабильной экспрессией, но и уничтожаются нетрансдуцированные лимфоциты.

Результаты, изложенные в разделе 3.4, были опубликованы в [227].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получение БМКП на основе CAR-НК- и CAR-НКТ-клеток, обладающих высокой противоопухолевой активностью, является сложным и трудоемким процессом. Существующие на сегодняшний день протоколы по *in vitro* созданию CAR-лимфоцитов у разных исследовательских групп существенно отличаются. Могут изменяться такие аспекты, как длительность культивирования, тип клеточной популяции, источник иммунных клеток, использование методов сепарации, способ внедрения в клетку генетической конструкции, использование активаторов пролиферации и наличие в питательной среде фидерных клеток. Тем не менее, выделяют две главные задачи: это генетическая модификация клеток и получение CAR-лимфоцитов в большом количестве и с высоким противоопухолевым потенциалом. Так как получение CAR-НКТ-клеток является недостаточно изученной технологией, то методология данного процесса на сегодняшний день слабо исследована. В целом, так как НКТ-клетки являются «промежуточным звеном» между Т-лимфоцитами и НК-клетками, то для их культивирования используются те же условия.

Несмотря на большое разнообразие существующих подходов к активации и трансдукции НК- и НКТ-клеток на данный момент не существует единого стандартизированного подхода. Теоретически оценить эффективность методик, применяемых разными исследовательскими группами, также является крайне затруднительным ввиду отличия в дизайнах проводимых исследований. Поэтому основным вектором данной работы была сравнительная характеристика и адаптация наиболее используемых подходов к культивированию и трансдукции первичной культуры лимфоцитов. Так исследование можно разделить на четыре направления – это анализ влияния различных комбинаций цитокинов на характеристики НК- и НКТ-клеток; изучение воздействия различных митогенов на популяции НК- и НКТ-клеток; оценка активирующего потенциала клеточной линии НЕК 293Т, используемой в качестве аллогенных фидерных клеток для

НК- и НКТ-клеток, а также подбор параметров для осуществления эффективной лентивирусной трансдукции лимфоцитов.

Кроме анализа существующих подходов к активации иммунных клеток, мы также решили разработать и оценить иные подходы, не описанные ранее в литературе. Так мы сравнили активацию НК- и НКТ-клеток, проводимую при помощи МАТ к CD3-, CD28-рецепторам, с активацией посредством L-ФГА (лектина, связывающегося с рецепторами Т-клеток [212]) или КонА (лектина, избирательно стимулирующего Т-лимфоциты [228]). В данной работе впервые детально изучали стимулирующее воздействие FCS, полисахарида, выделенным из морского огурца *Cucumaria japonica*, в качестве активатора пролиферации иммунных клеток. Кроме того, в качестве фидерных клеток мы тестировали клеточную линию почек эмбриона человека НЕК 293Т, которая, по данным литературы, ранее не использовали для активации иммунных клеток.

Итак, при изучении влияния различных комбинаций цитокинов (ИЛ-2+ИЛ-15, ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21, или только ИЛ-2) на популяции НК- и НКТ-клеток при их длительном культивировании в течение 21-го дня после активации посредством МАТ было установлено, что самый благоприятный эффект, а именно наибольшая пролиферация НК- и НКТ-клеток и высокая цитотоксичность, наблюдался при добавлении в питательную среду комбинации цитокинов ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21. Согласно литературным данным, ИЛ-21 существенно влияет на пролиферацию и противоопухолевую активность лимфоцитов, а также предотвращает ИЛ-15-индуцированное истощение клеток [207]. Режим длительного культивирования, активация МАТ и добавление данной комбинации цитокинов привели к преобладанию в первичной лимфоцитарной культуре НКТ-клеток. Относительная доля НК-клеток при применении данного протокола активации оставалась низкой, что указывает на необходимость использования других подходов к экспансии этой популяции.

При изучении различных активаторов пролиферации нецитокинового происхождения было установлено различие в действии данных веществ на отдельные лимфоцитарные популяции. Так L-ФГА стимулировал деление

Т-лимфоцитов и НК-клеток, а КонаА – Т-хелперов. МАТ оказывали наиболее существенное влияние на пролиферацию Т-лимфоцитов и НКТ-клеток. Добавление FCS при активации посредством МАТ усиливало пролиферативную активность лимфоцитов, при этом наблюдали наибольший прирост общего количества клеток при максимальной доле CD56+лимфоцитов. Таким образом, наиболее предпочтительным способом активации общей популяции НК- и НКТ-клеток являлась стимуляция при помощи МАТ+FCS. Выявление механизмов, посредством которых происходит стимуляция иммунных клеток при добавлении в питательную среду FCS, требует отдельного исследования. Вероятно, это можно сделать с использованием модифицированных образцов FCS – синтетических олигосахаридов, отражающих структурные фрагменты FCS [229].

Так как, исходя из литературных данных, наиболее оптимальным способом стимуляции деления НК-клеток является их соинкубация с фидерными клетками опухолевого происхождения, в данной работе было необходимо рассмотреть данный подход. В связи с этим был разработан и протестирован метод соинкубации первичной культуры лимфоцитов с обработанными митостатиком (Митомицином С) клетками культуры НЕК 293Т. Результаты данной серии экспериментов не только выявили потенциал использования клеток НЕК 293Т в качестве активатора иммунных клеток, но и показали значительный прирост НК-клеток уже на 4-й день культивирования (доля CD3-CD56+клеток составляла $43 \pm 4\%$), чего не удавалось добиться при использовании активаторов пролиферации или интерлейкинов. Культура НЕК 293Т была выбрана нами ввиду подверженности ее различным генетическим модификациям. Эта особенность позволит в дальнейшем создать модифицированную линию НЕК 293Т, экспрессирующую, по аналогии с многими фидерными линиями, дополнительные ОАА или мембраносвязанные ИЛ, что обеспечит более эффективную активацию иммунных клеток, в частности, НК-клеток.

В целях достижения высокой экспрессии CAR была отлажена методика концентрирования вирусодержащего материала и трансфекции пакующей линии.

Изучались методы активации лимфоцитов в контексте их возможного влияния на эффективность трансдукции, в одной из серий экспериментов перед трансдукцией проводили магнитную сепарацию клеток, также мы исследовали возможность селекции CAR-лимфоцитов для получения их обогащенной популяции. Так наилучшие результаты были получены при трансдукции лимфоцитов, которые после выделения подвергались магнитной сепарации (получение CD4+ и CD8+популяций) и затем активировались биodeградируемыми наночастицами.

Таким образом, на основании полученных в ходе исследования обобщенных данных, следует отметить, что оптимальной моделью для обогащения популяции НК-клеток среди представленных в данной работе является их однократная соинкубация с клеточной линией НЕК 293Т, а также культивирование в присутствии ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-21 в течение не более 14 дней. Для эффективной экспансии НКТ-клеток в качестве необходимых параметров культивирования следует отметить активацию МАТ к CD3-, CD28-рецепторам, культивирование не менее 21-го дня и периодическое добавление в питательную среду ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-21.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено, что при длительном культивировании первичной культуры МПК, активированной МАТ, добавление ИЛ-15 к ростовой среде, содержащей ИЛ-2, приводит к увеличению общего числа лимфоцитов, но снижает их цитотоксическую активность на $12\pm 7\%$. Наибольшая пролиферация НК- и НКТ-клеток (доля CD56+клеток составляет $60\pm 5\%$), а также самая высокая цитотоксическая активность (процент цитотоксичности $75\pm 5\%$) первичной культуры МПК наблюдается при использовании комбинации цитокинов ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21, по сравнению с клетками, культивируемыми в присутствии только ИЛ-2 или комбинации ИЛ-2+ИЛ-15.

2. При сравнительном анализе воздействия МАТ, L-ФГА и КонаА установлено, что наибольшая пролиферация НК-клеток (доля которых составляет $6\pm 1\%$) отмечается при использовании L-ФГА. Наиболее выраженный прирост доли НКТ-клеток ($52\pm 6\%$), наблюдается при активации посредством МАТ. Добавление FCS при активации лимфоцитов при помощи МАТ приводит к увеличению количества культивируемых клеток при наибольшей в сравнении с другими режимами активации (МАТ, L-ФГА и КонаА), доле CD56+лимфоцитов, составляющей $59\pm 6\%$.

3. Предварительная активация первичной культуры лимфоцитов с помощью МАТ с последующей соинкубацией с фидерными клетками НЕК 293Т на 8-й день культивирования приводит к возрастанию цитотоксической активности лимфоцитов и увеличению доли НК-клеток до $15\pm 2\%$ по сравнению с клетками, активированными только с использованием МАТ ($7\pm 1\%$). Однократная стимуляция фидерными клетками на 15-й день культивирования, а также двукратная стимуляция на 8-й и 15-й день снижают цитотоксическую активность лимфоцитов по сравнению с клетками, активированными только с использованием МАТ.

4. После активации первичной культуры лимфоцитов только фидерными клетками НЕК 293Т наблюдается увеличение экспрессии активационных

маркеров CD25, CD38, CD69 на поверхности CD56⁺клеток, а также возрастание доли НК-клеток до $43\pm 4\%$ на 4-й день после активации по сравнению с клетками, активированными только с использованием МАТ ($15\pm 2\%$).

5. Установлено, что концентрирование вирусосодержащей жидкости предпочтительнее проводить с использованием 25%-ного раствора PEG8000. Экспрессия GFP после трансфекции линии НЕК 293Т выше с применением липофектамина ($82\pm 7\%$) по сравнению с использованием кальций-фосфатного метода.

6. Показано, что самая высокая эффективность трансдукции (экспрессия CAR составляет $56\pm 10\%$) наблюдается при проведении этапа магнитной сепарации и последующей активаций лимфоцитов с помощью биodeградируемых наночастиц. Селекция CAR-лимфоцитов с помощью антибиотика бластицидина приводит к эффективному обогащению данной популяции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При культивировании первичной культуры лимфоцитов с целью повышения частоты клеточного деления и увеличения цитотоксичности требуется наличие в питательной среде таких провоспалительных цитокинов, как ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-21.

2. Для эффективного обогащения популяции НК-клеток в первичной культуре лимфоцитов человека без разделения клеточных популяций требуется этап соинкубации иммунных клеток с аллогенными фидерными клетками. Длительность культивирования не должна превышать 14 дней.

3. Для эффективного обогащения популяции НКТ-клеток в первичной культуре лимфоцитов человека без разделения клеточных популяций следует использовать МАТ к CD3-, CD28-рецепторам в начале культивирования в качестве активатора пролиферации. Оптимальной продолжительностью культивирования является 21 день.

4. С целью улучшения генетической модификации МПК предлагается разделение популяций лимфоцитов, проведение активации целевой популяции, увеличение множественности инфекции при трансдукции, а также последующая селекция CAR-лимфоцитов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

BaEV – эндогенный вирус бабуина

CAR – химерный рецептор антигена

CEM – культура клеток Т-лимфобластной лейкемии

CFSE – N-сукцинимидиловый эфир 6-карбоксихлорофлуоресцеина

CIML – цитокин-индуцированные НК-клетки памяти

CRISPR/Cas9 – система коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами

CTLA-4 – Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4

EBV-TM-LCL – культура клеток В-клеточной лимфобластомы, трансформированной вирусом Эпштейна-Барр

FBS – фетальная бычья сыворотка

FCS – фукозилированный хондроитинсульфат

FITC – флуоресцеин изотиоционат

GFP – зеленый флуоресцентный белок

GMP – надлежащая производственная практика

Ig G4 – иммуноглобулин класса G4

Jurkat – культура клеток Т-лимфобластной лейкемии

K562 – культура клеток хронической миелогенной лейкемии

K562-mb15-41BBL – культура клеток K562, экспрессирующая мембраносвязанный ИЛ-15 и 41BBL

L-CAR – плазида pLenti-PGK-CD16-CAR

L-GFP – плазида pLenti-PGK-GFP

LNP – липидные наночастицы

L-ФГА – L-фитогемагглютинин

MAIT – ассоциированные со слизистой оболочкой инвариантные Т-клетки

MHC – молекулы главного комплекса гистосовместимости

PD-1 – рецептор запрограммированной клеточной смерти 1

PD-1L – лиганд рецептора запрограммированной клеточной смерти 1

PGK – промотор фосфоглицераткиназы
PI – пропидия йодид
PMA – форбол-12-миристан-13-ацетат
rAAV – рекомбинантный аденоассоциированный вирус
scFv – одноцепочечный вариабельный фрагмент моноклонального антитела
synNotch – синтетический рецептор семейства Notch
TCR – Т-клеточный рецептор
TIL – опухоль-инфильтрирующие лимфоциты
TIM-3 – Т-клеточный мембранный белок 3
TOR – мишень рапамицина у млекопитающих
TRAC – константная α -цепь Т-клеточного рецептора
Treg – Т-регуляторные лимфоциты
U937 – культура клеток промоноцитной лейкемии
VSV-G – вируса везикулярного стоматита
АЗКЦ – антитело-зависимая клеточная цитотоксичность
АПК – антигенпрезентирующие клетки
БМКП – биомедицинский клеточный продукт
ВСМ – вируссодержащий материал
ГСК/ГПК – гемопоэтические стволовые/прогениторные клетки
ДК – дендритные клетки
ИКТ – иммунные контрольные точки
ИЛ – интерлейкин
ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
ИФН- γ – интерферон- γ
КонА – конканавалин А
ЛПНП – липопротеины низкой плотности
МАТ – моноклональные антитела
МПК – мононуклеары периферической крови
НК-клетки – натуральные киллеры
ОАА – опухоль-ассоциированные антигены

ОАМП – опухоль-ассоциированные молекулярные паттерны

РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина»

РХПТ – реакция «хозяин против трансплантата»

СВЦ – синдромом высвобождения цитокинов

Тх – Т-хелперы

ФСБ – фосфатный буферный солевой раствор

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты

ЭС-клетки – эмбриональные стволовые клетки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mirzayans, R. What Are the Reasons for Continuing Failures in Cancer Therapy? Are Misleading/Inappropriate Preclinical Assays to Be Blamed? Might Some Modern Therapies Cause More Harm than Benefit? / R. Mirzayans, D. Murray // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 21. – P. 13217. – DOI 10.3390/ijms232113217.
2. Igarashi, Y. Cancer Vaccines: Toward the Next Breakthrough in Cancer Immunotherapy / Y. Igarashi, T. Sasada // *Journal of Immunology Research*. – 2020. – Vol. 2020. – P. 5825401. – DOI 10.1155/2020/5825401.
3. Pfefferle, A. You Have Got a Fast CAR: Chimeric Antigen Receptor NK Cells in Cancer Therapy / A. Pfefferle, N. D. Huntington // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12. – № 3. – P. 706. – DOI 10.3390/cancers12030706.
4. Novel insights in CAR-NK cells beyond CAR-T cell technology; promising advantages / H. Ebrahimiyan, A. Tamimi, B. Shokoohian [et al.] // *International Immunopharmacology*. – 2022. – Vol. 106. – P. 108587. – DOI 10.1016/j.intimp.2022.108587.
5. Breakthrough of solid tumor treatment: CAR-NK immunotherapy / W. Wang, Y. Liu, Z. He [et al.] // *Cell Death Discovery*. – 2024. – Vol. 10. – № 1. – P. 40. – DOI 10.1038/s41420-024-01815-9.
6. Hadiloo, K. CAR-NKT cell therapy: a new promising paradigm of cancer immunotherapy / K. Hadiloo, S. Tahmasebi, A. Esmailzadeh // *Cancer Cell International*. – 2023. – Vol. 23. – № 1. – P. 86. – DOI 10.1186/s12935-023-02923-9.
7. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy / P. S. A. Becker, G. Suck, P. Nowakowska [et al.] // *Cancer immunology, immunotherapy: CII*. – 2016. – Vol. 65. – № 4. – P. 477-484. – DOI 10.1007/s00262-016-1792-y.
8. Фёдорова, П. О. CAR НК-терапия: методы активации и экспансии НК-клеток / П. О. Фёдорова // *Acta Biomedica Scientifica*. – 2024. – Т. 9. – № 5. – С. 53-65. – DOI 10.29413/ABS.2024-9.5.6.

9. Carlsten, M. Genetic Manipulation of NK Cells for Cancer Immunotherapy: Techniques and Clinical Implications / M. Carlsten, R. W. Childs // *Frontiers in Immunology*. – 2015. – Vol. 6. – P. 266. – DOI 10.3389/fimmu.2015.00266.
10. Pérez-Herrero, E. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy / E. Pérez-Herrero, A. Fernández-Medarde // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* – 2015. – Vol. 93. – P. 52-79. – DOI 10.1016/j.ejpb.2015.03.018.
11. Gavas, S. Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges / S. Gavas, S. Quazi, T. M. Karpiński // *Nanoscale Research Letters*. – 2021. – Vol. 16. – № 1. – P. 173. – DOI 10.1186/s11671-021-03628-6.
12. Waldman, A. D. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice / A. D. Waldman, J. M. Fritz, M. J. Lenardo // *Nature Reviews. Immunology*. – 2020. – Vol. 20. – № 11. – P. 651-668. – DOI 10.1038/s41577-020-0306-5.
13. Jovčevska, I. The Therapeutic Potential of Nanobodies / I. Jovčevska, S. Muyltermans // *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceutics and Gene Therapy*. – 2020. – Vol. 34. – № 1. – P. 11-26. – DOI 10.1007/s40259-019-00392-z.
14. Современные представления о противоопухолевом иммунитете / И. Ж. Шубина, А. В. Сергеев, Л. Т. Мамедова [и др.] // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2015. – Т. 14. – № 3. – С. 19-28.
15. Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа: новые риски нового класса противоопухолевых средств / Е. В. Шубникова, Т. М. Букатина, Н. Ю. Вельц [и др.] // *Безопасность и риск фармакотерапии*. – 2020. – Т. 8. – № 1. – С. 9-22. – DOI 10.30895/2312-7821-2020-8-1-9-22.
16. Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges / J. A. Marin-Acevedo, B. Dholaria, A. E. Soyano [et al.] // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2018. – Vol. 11. – № 1. – P. 39. – DOI 10.1186/s13045-018-0582-8.

17. Kato J. Immunotherapy for advanced melanoma: current situation in Japan / Kato J., Uhara H. // *Japanese Journal of Clinical Oncology*. – 2021. – Vol. 51. – № 1. – P. 3-9. – DOI 10.1093/jjco/hyaa188.
18. A Critical Insight into the Clinical Translation of PD-1/PD-L1 Blockade Therapy in Clear Cell Renal Cell Carcinoma / C. E. Nunes-Xavier, J. C. Angulo, R. Pulido [et al.] // *Current Urology Reports*. – 2019. – Vol. 20. – № 1. – P. 1. – DOI 10.1007/s11934-019-0866-8.
19. Inhibitors of immune checkpoints—PD-1, PD-L1, CTLA-4—new opportunities for cancer patients and a new challenge for internists and general practitioners / M. Z. Wojtukiewicz, M. M. Rek, K. Karpowicz [et al.] // *Cancer Metastasis Reviews*. – 2021. – Vol. 40. – № 3. – P. 949-982. – DOI 10.1007/s10555-021-09976-0.
20. Anderson, A. C. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation / A. C. Anderson, N. Joller, V. K. Kuchroo // *Immunity*. – 2016. – Vol. 44. – № 5. – P. 989-1004. – DOI 10.1016/j.immuni.2016.05.001.
21. Marin-Acevedo, J. A. Next generation of immune checkpoint inhibitors and beyond / J. A. Marin-Acevedo, E. O. Kimbrough, Y. Lou // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2021. – Vol. 14. – P. 45. – DOI 10.1186/s13045-021-01056-8.
22. Abstract CT183: Phase (Ph) I/II study of MBG453± spartalizumab (PDR001) in patients (pts) with advanced malignancies / Curigliano G., Gelderblom H., Mach N. [et al.] // *Cancer Research*. – 2019. – Vol. 79. – P. 183. – DOI 10.1158/1538-7445.AM2019-CT183.
23. Phase 1a/1b study of first-in-class B7-H4 antibody, FPA150, as monotherapy in patients with advanced solid tumors / J. C. Sachdev, T. M. Bauer, S. P. Chawla [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2019. – Vol. 37 – P. 2529. – DOI 10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.2529.
24. Preliminary dose escalation results from a phase I/II, first-in-human study of MGC018 (anti-B7-H3 antibody-drug conjugate) in patients with advanced solid tumors / J. D. Powderly, S. Jang, J. Lohr [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2020. – Vol. 38. – № 15. – P. 3071. – DOI 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.3071.

25. COAST: An Open-Label, Phase II, Multidrug Platform Study of Durvalumab Alone or in Combination With Oleclumab or Monalizumab in Patients With Unresectable, Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer / R. S. Herbst, M. Majem, F. Barlesi [et al.] // *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2022. – Vol. 40. – № 29. – P. 3383-3393. – DOI 10.1200/JCO.22.00227.
26. 4-1BB Agonism Averts TIL Exhaustion and Licenses PD-1 Blockade in Glioblastoma and Other Intracranial Cancers / K. I. Woroniecka, K. E. Rhodin, C. Dechant [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2020. – Vol. 26. – № 6. – P. 1349-1358. – DOI 10.1158/1078-0432.CCR-19-1068.
27. Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies / C. Chester, M. F. Sanmamed, J. Wang [et al.] // *Blood*. – 2018. – Vol. 131. – Immunotherapy targeting 4-1BB. – № 1. – P. 49-57. – DOI 10.1182/blood-2017-06-741041.
28. Claus, C. The emerging landscape of novel 4-1BB (CD137) agonistic drugs for cancer immunotherapy / C. Claus, C. Ferrara-Koller, C. Klein // *mAbs*. – 2023. – Vol. 15. – № 1. – P. 2167189. – DOI 10.1080/19420862.2023.2167189.
29. Redmond, W. L. Challenges and opportunities in the development of combination immunotherapy with OX40 agonists / W. L. Redmond // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2023. – Vol. 23. – № 9. – P. 901-912. – DOI 10.1080/14712598.2023.2249396.
30. Starzer, A. M. New emerging targets in cancer immunotherapy: CD27 (TNFRSF7) / A. M. Starzer, A. S. Berghoff // *ESMO open*. – 2020. – Vol. 4. – № 3. – P. e000629. – DOI 10.1136/esmoopen-2019-000629.
31. Immune-checkpoint inhibitors: long-term implications of toxicity / D. B. Johnson, C. A. Nebhan, J. J. Moslehi [et al.] // *Nature Reviews. Clinical Oncology*. – 2022. – Vol. 19. – № 4. – P. 254-267. – DOI 10.1038/s41571-022-00600-w.

32. Crews, D. W. Prophylactic Cancer Vaccines Engineered to Elicit Specific Adaptive Immune Response / D. W. Crews, J. A. Dombroski, M. R. King // *Frontiers in Oncology*. – 2021. – Vol. 11. – P. 626463. – DOI 10.3389/fonc.2021.626463.
33. Bladder Cancer: Immunotherapy and Pelvic Lymph Node Dissection / Z. Fan, J. Deng, Y. Wang [et al.] // *Vaccines*. – 2024. – Vol. 12. – № 2. – P. 150. – DOI 10.3390/vaccines12020150.
34. Effective anti-metastatic melanoma vaccination with tumor cells transfected with MHC genes and/or infected with Newcastle disease virus (NDV) / D. Plaksin, A. Porgador, E. Vadai [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 1994. – Vol. 59. – № 6. – P. 796-801. – DOI 10.1002/ijc.2910590615.
35. Curran, M. A. Tumor vaccines expressing flt3 ligand synergize with ctla-4 blockade to reject preimplanted tumors / M. A. Curran, J. P. Allison // *Cancer Research*. – 2009. – Vol. 69. – № 19. – P. 7747-7755. – DOI 10.1158/0008-5472.CAN-08-3289.
36. Therapeutic Anti-Tumor Efficacy of DC-Based Vaccines Targeting TME-Associated Antigens Is Improved When Combined with a Chemokine-Modulating Regimen and/or Anti-PD-L1 / J. L. Taylor, K. M. Kokolus, P. H. Basse [et al.] // *Vaccines*. – 2024. – Vol. 12. – № 7. – P. 777. – DOI 10.3390/vaccines12070777.
37. Development and Clinical Applications of Therapeutic Cancer Vaccines with Individualized and Shared Neoantigens / Q. Hao, Y. Long, Y. Yang [et al.] // *Vaccines*. – 2024. – Vol. 12. – № 7. – P. 717. – DOI 10.3390/vaccines12070717.
38. Structure-aware deep model for MHC-II peptide binding affinity prediction / Y. Yu, L. Zu, J. Jiang [et al.] // *BMC genomics*. – 2024. – Vol. 25. – № 1. – P. 127. – DOI 10.1186/s12864-023-09900-6.
39. The prognostic and biology of tumour-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy of cancer / Y. Liu, Z. Liu, Y. Yang [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2023. – Vol. 129. – № 7. – P. 1041-1049. – DOI 10.1038/s41416-023-02321-y.
40. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report / S. A. Rosenberg, B. S. Packard, P. M. Aebersold [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 1988. – Vol. 319. – № 25. – P. 1676-1680. – DOI 10.1056/NEJM198812223192527.

41. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2 / S. A. Rosenberg, J. R. Yannelli, J. C. Yang [et al.] // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1994. – Vol. 86. – № 15. – P. 1159-1166. – DOI 10.1093/jnci/86.15.1159.
42. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy / S. A. Rosenberg, J. C. Yang, R. M. Sherry [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2011. – Vol. 17. – № 13. – P. 4550-4557. – DOI 10.1158/1078-0432.CCR-11-0116.
43. Adoptive T cell immunotherapy for cancer / K. Perica, J. C. Varela, M. Oelke [et al.] // *Rambam Maimonides Medical Journal*. – 2015. – Vol. 6. – № 1. – P. e0004. – DOI 10.5041/RMMJ.10179.
44. Farkona, S. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? / S. Farkona, E. P. Diamandis, I. M. Blasutig // *BMC medicine*. – 2016. – Vol. 14. – P. 73. – DOI 10.1186/s12916-016-0623-5.
45. Hamdan, F. Cancer immunotherapies: A hope for the incurable? / F. Hamdan, V. Cerullo // *Frontiers in Molecular Medicine*. – 2023. – Vol. 3. – P. 1140977. – DOI 10.3389/fmmed.2023.1140977.
46. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia / D. L. Porter, B. L. Levine, M. Kalos [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2011. – Vol. 365. – № 8. – P. 725-733. – DOI 10.1056/NEJMoa1103849.
47. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study / J. S. Abramson, M. L. Palomba, L. I. Gordon [et al.] // *Lancet (London, England)*. – 2020. – Vol. 396. – № 10254. – P. 839-852. – DOI 10.1016/S0140-6736(20)31366-0.
48. Bagley, S. J. Clinical investigation of CAR T cells for solid tumors: Lessons learned and future directions / S. J. Bagley, D. M. O'Rourke // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2020. – Vol. 205. – P. 107419. – DOI 10.1016/j.pharmthera.2019.107419.

49. Inhibition of Interleukin-10 in the tumor microenvironment can restore mesothelin chimeric antigen receptor T cell activity in pancreatic cancer in vitro / R. B. Batchu, O. V. Gruzdyn, E. M. Mahmud [et al.] // *Surgery*. – 2018. – Vol. 163. – № 3. – P. 627-632. – DOI 10.1016/j.surg.2017.10.056.
50. A phase I clinical trial of adoptive T cell therapy using IL-12 secreting MUC-16(ecto) directed chimeric antigen receptors for recurrent ovarian cancer / M. Koneru, R. O’Cearbhaill, S. Pendharkar [et al.] // *Journal of Translational Medicine*. – 2015. – Vol. 13. – P. 102. – DOI 10.1186/s12967-015-0460-x.
51. Design of a phase I clinical trial to evaluate intratumoral delivery of ErbB-targeted chimeric antigen receptor T-cells in locally advanced or recurrent head and neck cancer / M. C. I. van Schalkwyk, S. E. Papa, J. P. Jeannon [et al.] // *Human Gene Therapy. Clinical Development*. – 2013. – Vol. 24. – № 3. – P. 134-142. – DOI 10.1089/humc.2013.144.
52. c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance / R. C. Lynn, E. W. Weber, E. Sotillo [et al.] // *Nature*. – 2019. – Vol. 576. – № 7786. – P. 293-300. – DOI 10.1038/s41586-019-1805-z.
53. Current advances in experimental and computational approaches to enhance CAR T cell manufacturing protocols and improve clinical efficacy / A. S. Colina, V. Shah, R. K. Shah [et al.] // *Frontiers in Molecular Medicine*. – 2024. – Vol. 4. – P. 1310002. – DOI 10.3389/fmmed.2024.1310002.
54. Chimeric antigen receptor T-cell therapy — assessment and management of toxicities | *Nature Reviews Clinical Oncology* / Neelapu S.S., Tummala S., Kebriaei P. [et al.] // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2018. – Vol. 15. – №1. – P. 47-62. – DOI 10.1038/nrclinonc.2017.148.
55. Systematic improvements in lentiviral transduction of primary human natural killer cells undergoing ex vivo expansion / D. S. J. Allan, M. Chakraborty, G. C. Waller [et al.] // *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*. – 2021. – Vol. 20. – P. 559-571. – DOI 10.1016/j.omtm.2021.01.008.
56. Design and analysis of stably integrated reporters for inducible transgene expression in human T cells and CAR NK-cell lines / S. V. Kulemzin, D. A. Matvienko,

- A. H. Sabirov [et al.] // BMC medical genomics. – 2019. – Vol. 12. – № 2. – P. 44. – DOI 10.1186/s12920-019-0489-4.
57. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection / J. Eyquem, J. Mansilla-Soto, T. Giavridis [et al.] // Nature. – 2017. – Vol. 543. – № 7643. – P. 113-117. – DOI 10.1038/nature21405.
58. Chimeric antigen receptor natural killer (CAR-NK) cell design and engineering for cancer therapy / Y. Gong, R. G. J. Klein Wolterink, J. Wang [et al.] // Journal of Hematology & Oncology. – 2021. – Vol. 14. – № 1. – P. 73. – DOI 10.1186/s13045-021-01083-5.
59. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for T-cell acute lymphoblastic leukemia / B. L. Z. Oh, N. Vinanica, D. M. H. Wong [et al.] // Haematologica. – 2024. – Vol. 109. – № 6. – P. 1677-1688. – DOI 10.3324/haematol.2023.283848.
60. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2 / R. A. Morgan, J. C. Yang, M. Kitano [et al.] // Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. – 2010. – Vol. 18. – № 4. – P. 843-851. – DOI 10.1038/mt.2010.24.
61. Impact of scFv structure in chimeric antigen receptor on receptor expression efficiency and antigen recognition properties / K. Fujiwara, M. Masutani, M. Tachibana [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2020. – Vol. 527. – № 2. – P. 350-357. – DOI 10.1016/j.bbrc.2020.03.071.
62. Identification of Potent CD19 scFv for CAR T Cells through scFv Screening with NK/T-Cell Line / C. H. Kang, Y. Kim, H. K. Lee [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21. – № 23. – P. 9163. – DOI 10.3390/ijms21239163.
63. Limitations in the Design of Chimeric Antigen Receptors for Cancer Therapy / S. Stoiber, B. L. Cadilha, M. R. Benmebarek [et al.] // Cells. – 2019. – Vol. 8. – № 5. – P. 472. – DOI 10.3390/cells8050472.
64. An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability / M. Whitlow, B. A. Bell, S. L. Feng [et al.] // Protein Engineering. – 1993. – Vol. 6. – № 8. – P. 989-995. – DOI 10.1093/protein/6.8.989.

65. Function of Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptors with Human Variable Regions Is Affected by Hinge and Transmembrane Domains / L. Alabanza, M. Pegues, C. Geldres [et al.] // *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. – 2017. – Vol. 25. – № 11. – P. 2452-2465. – DOI 10.1016/j.ymthe.2017.07.013.
66. A safe and potent anti-CD19 CAR T cell therapy / Z. Ying, X. F. Huang, X. Xiang [et al.] // *Nature Medicine*. – 2019. – Vol. 25. – № 6. – P. 947-953. – DOI 10.1038/s41591-019-0421-7.
67. Human iPSC-Derived Natural Killer Cells Engineered with Chimeric Antigen Receptors Enhance Anti-tumor Activity / Y. Li, D. L. Hermanson, B. S. Moriarity [et al.] // *Cell Stem Cell*. – 2018. – Vol. 23. – № 2. – P. 181-192.e5. – DOI 10.1016/j.stem.2018.06.002.
68. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions / Y. Kuwana, Y. Asakura, N. Utsunomiya [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1987. – Vol. 149. – № 3. – P. 960-968. – DOI 10.1016/0006-291x(87)90502-x.
69. Hong, M. Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy / M. Hong, J. D. Clubb, Y. Y. Chen // *Cancer Cell*. – 2020. – Vol. 38. – № 4. – P. 473-488. – DOI 10.1016/j.ccell.2020.07.005.
70. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells / O. U. Kawalekar, R. S. O'Connor, J. A. Fraietta [et al.] // *Immunity*. – 2016. – Vol. 44. – № 2. – P. 380-390. – DOI 10.1016/j.immuni.2016.01.021.
71. Blockade of interleukin 10 potentiates antitumour immune function in human colorectal cancer liver metastases / K. M. Sullivan, X. Jiang, P. Guha [et al.] // *Gut*. – 2023. – Vol. 72. – № 2. – P. 325-337. – DOI 10.1136/gutjnl-2021-325808.
72. Enhancing CAR T cell persistence through ICOS and 4-1BB costimulation / S. Guedan, A. D. Posey, C. Shaw [et al.] // *JCI insight*. – 2018. – Vol. 3. – № 1. – P. 96976. – DOI 10.1172/jci.insight.96976.

73. Martinez, M. CAR T Cells for Solid Tumors: New Strategies for Finding, Infiltrating, and Surviving in the Tumor Microenvironment / M. Martinez, E. K. Moon // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 128. – DOI 10.3389/fimmu.2019.00128.
74. Xu, Y. Interleukin-12 in multimodal tumor therapies for induction of anti-tumor immunity / Y. Xu, X. Sun, Y. Tong // *Discover Oncology*. – 2024. – Vol. 15. – № 1. – P. 170. – DOI 10.1007/s12672-024-01011-2.
75. Augmentation of Antitumor Immunity by Human and Mouse CAR T Cells Secreting IL-18 / B. Hu, J. Ren, Y. Luo [et al.] // *Cell Reports*. – 2017. – Vol. 20. – № 13. – P. 3025-3033. – DOI 10.1016/j.celrep.2017.09.002.
76. Nishio, N. Oncolytic virus expressing RANTES and IL-15 enhances function of CAR-modified T cells in solid tumors / N. Nishio, G. Dotti // *Oncoimmunology*. – 2015. – Vol. 4. – № 2. – P. e988098. – DOI 10.4161/21505594.2014.988098.
77. IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor / Adachi K., Kano Y., Nagai T. [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2018. – Vol. 36. – № 4. – P. 346-351. – DOI 10.1038/nbt.4086.
78. Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy / Rafiq S., Hackett C. S., Brentjens R. J. // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2020. – Vol. 17. – № 3. – P. 147-167. – DOI 10.1038/s41571-019-0297-y.
79. Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits / K. T. Roybal, L. J. Rupp, L. Morsut [et al.] // *Cell*. – 2016. – Vol. 164. – № 4. – P. 770-779. – DOI 10.1016/j.cell.2016.01.011.
80. Logic-Gated ROR1 Chimeric Antigen Receptor Expression Rescues T Cell-Mediated Toxicity to Normal Tissues and Enables Selective Tumor Targeting / S. Srivastava, A. I. Salter, D. Liggitt [et al.] // *Cancer Cell*. – 2019. – Vol. 35. – № 3. – P. 489-503. – DOI 10.1016/j.ccell.2019.02.003.
81. Thomas, P. Arming V δ 2 T Cells with Chimeric Antigen Receptors to Combat Cancer / P. Thomas, P. Paris, C. Pecqueur // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2024. – Vol. 30. – № 15. – P. 3105-3116. – DOI 10.1158/1078-0432.CCR-23-3495.

82. Cellular senescence in metastatic prostate cancer: A therapeutic opportunity or challenge (Review) / C. Jin, S. Liao, G. Lu [et al.] // *Molecular Medicine Reports*. – 2024. – Vol. 30. – № 3. – P. 162. – DOI 10.3892/mmr.2024.13286.
83. Efficient combinatorial targeting of RNA transcripts in single cells with Cas13 RNA Perturb-seq / H. H. Wessels, A. Méndez-Mancilla, Y. Hao [et al.] // *Nature Methods*. – 2023. – Vol. 20. – № 1. – P. 86-94. – DOI 10.1038/s41592-022-01705-x.
84. Genetically Engineered CLDN18.2 CAR-T Cells Expressing Synthetic PD1/CD28 Fusion Receptors Produced Using a Lentiviral Vector / H. J. Lee, S. J. Hwang, E. H. Jeong [et al.] // *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*. – 2024. – Vol. 62. – № 7. – P. 555-568. – DOI 10.1007/s12275-024-00133-0.
85. Preclinical Development of Bivalent Chimeric Antigen Receptors Targeting Both CD19 and CD22 / H. Qin, S. Ramakrishna, S. Nguyen [et al.] // *Molecular Therapy Oncolytics*. – 2018. – Vol. 11. – P. 127-137. – DOI 10.1016/j.omto.2018.10.006.
86. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy / Fry T. J., Shah N. N., Orentas R. J. [et al.] // *Nature Medicine*. – 2018. – Vol. 24. – № 1. – P. 20-28. – DOI 10.1038/nm.4441.
87. Modulation of chimeric antigen receptor surface expression by a small molecule switch / Juillerat A., Tkach D., Busser B. W. [et al.] // *BMC Biotechnology*. – 2019. – Vol. 19. – № 1. – P. 44. – DOI 10.1186/s12896-019-0537-3.
88. An oxygen sensitive self-decision making engineered CAR T-cell / Juillerat A., Marechal A., Filhol J. M. [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 20 – № 7. – P. 39833. – DOI 10.1038/srep39833.
89. Chemically Programmable and Switchable CAR-T Therapy / J. Qi, K. Tsuji, D. Hymel [et al.] // *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. – 2020. – Vol. 59. – № 29. – P. 12178-12185. – DOI 10.1002/anie.202005432.
90. Watanabe, N. Generation of CAR T-cells using γ -retroviral vector / N. Watanabe, M. K. McKenna // *Methods in Cell Biology*. – 2022. – Vol. 167. – P. 171-183. – DOI 10.1016/bs.mcb.2021.06.014.

91. A guide to manufacturing CAR T cell therapies / P. Vormittag, R. Gunn, S. Ghorashian [et al.] // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2018. – Vol. 53. – P. 164-181. – DOI 10.1016/j.copbio.2018.01.025.
92. Novel extragenic genomic safe harbors for precise therapeutic T-cell engineering / A. Odak, H. Yuan, J. Feucht [et al.] // *Blood*. – 2023. – Vol. 141. – № 22. – P. 2698-2712. – DOI 10.1182/blood.2022018924.
93. Viral vector platforms within the gene therapy landscape / J. T. Bulcha, Y. Wang, H. Ma [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2021. – Vol. 6. – № 1. – P. 53. – DOI 10.1038/s41392-021-00487-6.
94. Various AAV Serotypes and Their Applications in Gene Therapy: An Overview / S. S. Issa, A. A. Shaimardanova, V. V. Solovyeva [et al.] // *Cells*. – 2023. – Vol. 12. – № 5. – P. 785. – DOI 10.3390/cells12050785.
95. Evaluating the state of the science for adeno-associated virus integration: An integrated perspective / D. E. Sabatino, F. D. Bushman, R. J. Chandler [et al.] // *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. – 2022. – Vol. 30. – № 8. – P. 2646-2663. – DOI 10.1016/j.ymthe.2022.06.004.
96. AAV genome modification for efficient AAV production / W. Asaad, P. Volos, D. Maksimov [et al.] // *Heliyon*. – 2023. – Vol. 9. – № 4. – P. e15071. – DOI 10.1016/j.heliyon.2023.e15071.
97. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery / Wang D., Tai P. W. L., Gao G. // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2019. – Vol. 18. – P. 358-378. – DOI 10.1038/s41573-019-0012-9.
98. Optimizing rAAV6 transduction of primary T cells for the generation of anti-CD19 AAV-CAR-T cells / D. Wang, Q. Zhou, X. Qiu [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2022. – Vol. 150. – P. 113027. – DOI 10.1016/j.biopha.2022.113027.
99. Nonviral genome engineering of natural killer cells / Robbins G. M., Wang M., Pomeroy E. J. [et al.] // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2021. – Vol. 12. – №1. – P. 350. – DOI 10.1186/s13287-021-02406-6.

100. The Past, Present, and Future of Non-Viral CAR T Cells / A. Moretti, M. Ponzo, C. A. Nicolette [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 867013. – DOI 10.3389/fimmu.2022.867013.
101. Efficient Non-viral Gene Delivery into Human Hematopoietic Stem Cells by Minicircle Sleeping Beauty Transposon Vectors / M. Holstein, C. Mesa-Nuñez, C. Miskey [et al.] // *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. – 2018. – Vol. 26. – № 4. – P. 1137-1153. – DOI 10.1016/j.ymthe.2018.01.012.
102. Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL / J. Zhang, Y. Hu, J. Yang [et al.] // *Nature*. – 2022. – Vol. 609. – № 7926. – P. 369-374. – DOI 10.1038/s41586-022-05140-y.
103. CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges / M. Chen, A. Mao, M. Xu [et al.] // *Cancer Letters*. – 2019. – Vol. 447. – P. 48-55. – DOI 10.1016/j.canlet.2019.01.017.
104. Kang, D. D. Advancements of in vitro transcribed mRNA (IVT mRNA) to enable translation into the clinics / D. D. Kang, H. Li, Y. Dong // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2023. – Vol. 199. – P. 114961. – DOI 10.1016/j.addr.2023.114961.
105. Preclinical evaluation of CD8+ anti-BCMA mRNA CAR T cells for treatment of multiple myeloma | Leukemia / Lin, L., Cho, SF., Xing, L. [et al.] // *Leukemia*. – 2021. – Vol. 35. – P. 752–763. – DOI 10.1038/s41375-020-0951-5.
106. Effect of Experimental Electrical and Biological Parameters on Gene Transfer by Electroporation: A Systematic Review and Meta-Analysis / T. Potočnik, A. Maček Lebar, Š. Kos [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – № 12. – P. 2700. – DOI 10.3390/pharmaceutics14122700.
107. Ng, Y. Y. CXCR1 Expression to Improve Anti-Cancer Efficacy of Intravenously Injected CAR-NK Cells in Mice with Peritoneal Xenografts / Y. Y. Ng, J. C. K. Tay, S. Wang // *Molecular Therapy Oncolytics*. – 2020. – Vol. 16. – P. 75-85. – DOI 10.1016/j.omto.2019.12.006.
108. Human CAR NK Cells: A New Non-viral Method Allowing High Efficient Transfection and Strong Tumor Cell Killing / T. Ingegnere, F. R. Mariotti, A. Pelosi [et

- al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 957. – DOI 10.3389/fimmu.2019.00957.
109. The nano delivery systems and applications of mRNA / M. Li, Y. Li, S. Li [et al.] // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2022. – Vol. 227. – P. 113910. – DOI 10.1016/j.ejmech.2021.113910.
110. Maia A. Genetic Manipulation Approaches to Enhance the Clinical Application of NK Cell-Based Immunotherapy / Maia A., Tarannum M., Romee R. // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2024. – Vol. 13. – №3. – P. 230-242. – DOI 10.1093/stcltm/szad087.
111. Recent advances in mRNA-LNP therapeutics: immunological and pharmacological aspects / S. H. Kiaie, N. Majidi Zolbanin, A. Ahmadi [et al.] // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2022. – Vol. 20. – № 1. – P. 276. – DOI 10.1186/s12951-022-01478-7.
112. Manufacturing chimeric antigen receptor T cells: issues and challenges / C. Roddie, M. O'Reilly, J. Dias Alves Pinto [et al.] // *Cytotherapy*. – 2019. – Vol. 21. – № 3. – P. 327-340. – DOI 10.1016/j.jcyt.2018.11.009.
113. Choi, G. Price and Prejudice? The Value of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy / G. Choi, G. Shin, S. Bae // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2022. – Vol. 19. – № 19. – P. 12366. – DOI 10.3390/ijerph191912366.
114. Allogeneic CAR-T Cells: More than Ease of Access? / C. Graham, A. Jozwik, A. Pepper [et al.] // *Cells*. – 2018. – Vol. 7. – № 10. – P. 155. – DOI 10.3390/cells7100155.
115. GMP-Compliant Manufacturing of NKG2D CAR Memory T Cells Using CliniMACS Prodigy / L. Fernández, A. Fernández, I. Mirones [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 2361. – DOI 10.3389/fimmu.2019.02361.
116. Themeli, M. New cell sources for T cell engineering and adoptive immunotherapy / M. Themeli, I. Rivière, M. Sadelain // *Cell Stem Cell*. – 2015. – Vol. 16. – № 4. – P. 357-366. – DOI 10.1016/j.stem.2015.03.011.
117. Genome-edited, donor-derived allogeneic anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells in paediatric and adult B-cell acute lymphoblastic leukaemia: results of two phase

- 1 studies / R. Benjamin, C. Graham, D. Yallop [et al.] // *Lancet* (London, England). – 2020. – Vol. 396. – № 10266. – P. 1885-1894. – DOI 10.1016/S0140-6736(20)32334-5.
118. Davies, D. M. Crosstown Traffic: Lymphodepleting Chemotherapy Drives CAR T Cells / D. M. Davies, J. Maher // *Cancer Cell*. – 2021. – Vol. 39. – № 2. – P. 138-140. – DOI 10.1016/j.ccell.2020.12.019.
119. Ruella, M. Catch me if you can: Leukemia Escape after CD19-Directed T Cell Immunotherapies / M. Ruella, M. V. Maus // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. – 2016. – Vol. 14. – P. 357-362. – DOI 10.1016/j.csbj.2016.09.003.
120. Challenges and opportunities in achieving effective regulatory T cell therapy in autoimmune liver disease / N. Richardson, G. E. Wootton, A. G. Bozward [et al.] // *Seminars in Immunopathology*. – 2022. – Vol. 44. – № 4. – P. 461-474. – DOI 10.1007/s00281-022-00940-w.
121. New insights in systemic lupus erythematosus: From regulatory T cells to CAR-T-cell strategies / M. Doglio, T. Alexander, N. Del Papa [et al.] // *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2022. – Vol. 150. – № 6. – P. 1289-1301. – DOI 10.1016/j.jaci.2022.08.003.
122. Park, J. H. Function of $\gamma\delta$ T cells in tumor immunology and their application to cancer therapy / J. H. Park, H. K. Lee // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2021. – Vol. 53. – № 3. – P. 318-327. – DOI 10.1038/s12276-021-00576-0.
123. Broad Cytotoxic Targeting of Acute Myeloid Leukemia by Polyclonal Delta One T Cells / B. Di Lorenzo, A. E. Simões, F. Caiado [et al.] // *Cancer Immunology Research*. – 2019. – Vol. 7. – № 4. – P. 552-558. – DOI 10.1158/2326-6066.CIR-18-0647.
124. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers / A. J. Gentles, A. M. Newman, C. L. Liu [et al.] // *Nature Medicine*. – 2015. – Vol. 21. – № 8. – P. 938-945. – DOI 10.1038/nm.3909.
125. Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma / J. Bennouna, E. Bompas, E. M. Neidhardt [et al.] //

Cancer immunology, immunotherapy: CII. – 2008. – Vol. 57. – № 11. – P. 1599-1609. – DOI 10.1007/s00262-008-0491-8.

126. Chimeric Antigen Receptor-Engineered Human Gamma Delta T Cells: Enhanced Cytotoxicity with Retention of Cross Presentation / A. Capsomidis, G. Benthall, H. H. Van Acker [et al.] // *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. – 2018. – Vol. 26. – № 2. – P. 354-365. – DOI 10.1016/j.ymthe.2017.12.001.

127. Gamma-Delta CAR-T Cells Show CAR-Directed and Independent Activity Against Leukemia / M. Rozenbaum, A. Meir, Y. Aharony [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1347. – DOI 10.3389/fimmu.2020.01347.

128. The biology and functional importance of MAIT cells / D. I. Godfrey, H.-F. Koay, J. McCluskey [et al.] // *Nature Immunology*. – 2019. – Vol. 20. – № 9. – P. 1110-1128. – DOI 10.1038/s41590-019-0444-8.

129. Engineering Human MAIT Cells with Chimeric Antigen Receptors for Cancer Immunotherapy / M. Dogan, E. Karhan, L. Kozhaya [et al.] // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 2022. – Vol. 209. – № 8. – P. 1523-1531. – DOI 10.4049/jimmunol.2100856.

130. CD8+CD161+ T-Cells: Cytotoxic Memory Cells With High Therapeutic Potential / V. Konduri, D. Oyewole-Said, J. Vazquez-Perez [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 613204. – DOI 10.3389/fimmu.2020.613204.

131. Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy / M. Klichinsky, M. Ruella, O. Shestova [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2020. – Vol. 38. – № 8. – P. 947-953. – DOI 10.1038/s41587-020-0462-y.

132. A phase 1, first in human study of adenovirally transduced autologous macrophages engineered to contain an anti-HER2 chimeric antigen receptor (CAR) in subjects with HER2 overexpressing solid tumors / K. A. Reiss, Y. Yuan, D. Barton [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2022. – Vol. 40. – № 4. – P. TPS668-TPS668. – DOI 10.1200/JCO.2022.40.4_suppl.TPS668.

133. Chimeric antigen receptors that trigger phagocytosis / M. A. Morrissey, A. P. Williamson, A. M. Steinbach [et al.] // *eLife*. – 2018. – Vol. 7. – P. e36688. – DOI 10.7554/eLife.36688.

134. CAR race to cancer immunotherapy: from CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy / Pan K., Farrukh H., Chittepu V. C. S. R. [et al.] // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2022. – Vol. 41. – №1. – P. 119. – DOI 10.1186/s13046-022-02327-z.
135. Neutrophil kinetics in health and disease / C. Summers, S. M. Rankin, A. M. Condliffe [et al.] // *Trends in Immunology*. – 2010. – Vol. 31. – № 8. – P. 318-324. – DOI 10.1016/j.it.2010.05.006.
136. Engineering chimeric antigen receptor neutrophils from human pluripotent stem cells for targeted cancer immunotherapy / Y. Chang, R. Syahirah, X. Wang [et al.] // *Cell Reports*. – 2022. – Vol. 40. – № 3. – P. 111128. – DOI 10.1016/j.celrep.2022.111128.
137. HIV-specific Immunity Derived From Chimeric Antigen Receptor-engineered Stem Cells / A. Zhen, M. Kamata, V. Rezek [et al.] // *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. – 2015. – Vol. 23. – № 8. – P. 1358-1367. – DOI 10.1038/mt.2015.102.
138. Ex Vivo Generation of CAR Macrophages from Hematopoietic Stem and Progenitor Cells for Use in Cancer Therapy / D. Paasch, J. Meyer, A. Stamopoulou [et al.] // *Cells*. – 2022. – Vol. 11. – № 6. – P. 994. – DOI 10.3390/cells11060994.
139. Optimization of the proliferation and persistency of CAR T cells derived from human induced pluripotent stem cells / T. Ueda, S. Shiina, S. Iriguchi [et al.] // *Nature Biomedical Engineering*. – 2023. – Vol. 7. – № 1. – P. 24-37. – DOI 10.1038/s41551-022-00969-0.
140. Generation of highly proliferative, rejuvenated cytotoxic T cell clones through pluripotency reprogramming for adoptive immunotherapy / Y. Kawai, A. Kawana-Tachikawa, S. Kitayama [et al.] // *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. – 2021. – Vol. 29. – № 10. – P. 3027-3041. – DOI 10.1016/j.ymthe.2021.05.016.
141. Lyadova, I. Macrophages derived from pluripotent stem cells: prospective applications and research gaps / I. Lyadova, A. Vasiliev // *Cell & Bioscience*. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 96. – DOI 10.1186/s13578-022-00824-4.

142. Krijgsman, D. The Role of Natural Killer T Cells in Cancer-A Phenotypical and Functional Approach / D. Krijgsman, M. Hokland, P. J. K. Kuppen // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 367. – DOI 10.3389/fimmu.2018.00367.
143. CAR products from novel sources: a new avenue for the breakthrough in cancer immunotherapy / J. Huang, Q. Yang, W. Wang [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2024. – Vol. 15. – P. 1378739. – DOI 10.3389/fimmu.2024.1378739.
144. Engineering allorejection-resistant CAR-NKT cells from hematopoietic stem cells for off-the-shelf cancer immunotherapy / Y.-R. Li, Y. Zhou, J. Yu [et al.] // *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. – 2024. – Vol. 32. – № 6. – P. 1849-1874. – DOI 10.1016/j.ymthe.2024.04.005.
145. NKT Cells Coexpressing a GD2-Specific Chimeric Antigen Receptor and IL15 Show Enhanced In Vivo Persistence and Antitumor Activity against Neuroblastoma / X. Xu, W. Huang, A. Heczey [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2019. – Vol. 25. – № 23. – P. 7126-7138. – DOI 10.1158/1078-0432.CCR-19-0421.
146. CD62L+ NKT cells have prolonged persistence and antitumor activity in vivo / G. Tian, A. N. Courtney, B. Jena [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2016. – Vol. 126. – № 6. – P. 2341-2355. – DOI 10.1172/JCI83476.
147. Enhanced Anti-lymphoma Activity of CAR19-iNKT Cells Underpinned by Dual CD19 and CD1d Targeting / A. Rotolo, V. S. Caputo, M. Holubova [et al.] // *Cancer Cell*. – 2018. – Vol. 34. – № 4. – P. 596-610.e11. – DOI 10.1016/j.ccell.2018.08.017.
148. Preclinical Evaluation of Invariant Natural Killer T Cells Modified with CD38 or BCMA Chimeric Antigen Receptors for Multiple Myeloma / R. Poels, E. Drent, R. Lameris [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 3. – P. 1096. – DOI 10.3390/ijms22031096.
149. Multipurposing CARs: Same engine, different vehicles / A. K. M. N. Hossian, C. S. Hackett, R. J. Brentjens [et al.] // *Molecular Therapy*. – 2022. – Vol. 30. – № 4. – P. 1381-1395. – DOI 10.1016/j.ymthe.2022.02.012.

150. From CAR-T Cells to CAR-NK Cells: A Developing Immunotherapy Method for Hematological Malignancies / H. Lu, X. Zhao, Z. Li [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2021. – Vol. 11. – P. 720501. – DOI 10.3389/fonc.2021.720501.
151. Естественные киллеры: происхождение, фенотип, функции. / Е. В. Тыщук, В. А. Михайлова, С. А. Сельков [и др.] // *Медицинская иммунология*. – 2021. – Т. 23. – № 6. – С. 1207-1228. – DOI 10.15789/1563-0625-NKC-2330.
152. Chandra, D. J. The Immune Resistance Signature of Acute Myeloid Leukemia and Current Immunotherapy Strategies / D. J. Chandra, B. Alber, J. N. Saultz // *Cancers*. – 2024. – Vol. 16. – № 15. – P. 2615. – DOI 10.3390/cancers16152615.
153. Manufacturing Natural Killer Cells as Medicinal Products / Chabannon C., Mfarrej B., Guia S. [et al.] // *Frontiers*. – 2016. – Vol. 7. – P. 504. – DOI 10.3389/fimmu.2016.00504.
154. Berrien-Elliott, M. M. Allogeneic natural killer cell therapy / Berrien-Elliott M. M., Jacobs M. T., Fehniger T. A. // *Blood*. – 2023. – Vol. 141. – №8. – P. 856-868. – DOI 10.1182/blood.2022016200.
155. A novel method to expand large numbers of CD56(+) natural killer cells from a minute fraction of selectively accessed cryopreserved cord blood for immunotherapy after transplantation / S. Vasu, M. Berg, J. Davidson-Moncada [et al.] // *Cytotherapy*. – 2015. – Vol. 17. – № 11. – P. 1582-1593. – DOI 10.1016/j.jcyt.2015.07.020.
156. Current Perspectives on “Off-The-Shelf” Allogeneic NK and CAR-NK Cell Therapies / Heipertz E. L., Zynda E. R., Stav-Noraas T. E. [et al.] // *Frontiers*. – 2021. – Vol. 12. – P. 732135. – DOI 10.3389/fimmu.2021.732135.
157. CAR-NK cells: the next wave of cellular therapy for cancer / M. Daher, L. Melo Garcia, Y. Li [et al.] // *Clinical & Translational Immunology*. – 2021. – Vol. 10. – № 4. – P. e1274. – DOI 10.1002/cti2.1274.
158. Advances in CAR-NK cell therapy for hematological malignancies / R. Yang, Y. Yang, R. Liu [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2024. – Vol. 15. – P. 1414264. – DOI 10.3389/fimmu.2024.1414264.

159. NK-92 cells retain vitality and functionality when grown in standard cell culture conditions / R. Kotzur, A. Duev-Cohen, I. Kol [et al.] // *PloS One*. – 2022. – Vol. 17. – № 3. – P. e0264897. – DOI 10.1371/journal.pone.0264897.
160. Mazinani, M. New cell sources for CAR-based immunotherapy / Mazinani M., Rahbarizadeh F. // *Biomarker Research*. – 2023. – Vol. 11. – № 1. – P. 49. – DOI 10.1186/s40364-023-00482-9.
161. CD16+NK-92 and anti-CD123 monoclonal antibody prolongs survival in primary human acute myeloid leukemia xenografted mice / B. A. Williams, X.-H. Wang, J. V. Leyton [et al.] // *Haematologica*. – 2018. – Vol. 103. – № 10. – P. 1720-1729. – DOI 10.3324/haematol.2017.187385.
162. Genetic Engineering and Enrichment of Human NK Cells for CAR-Enhanced Immunotherapy of Hematological Malignancies / M. Soldierer, A. Bister, C. Haist [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 847008. – DOI 10.3389/fimmu.2022.847008.
163. Biederstädt, A. Engineering the next generation of CAR-NK immunotherapies / Biederstädt A., Rezvani K. // *International Journal of Hematology*. – 2021. – Vol. 114. – № 5. – P. 554-571. – DOI 10.1007/s12185-021-03209-4.
164. Milone, M. C. Clinical use of lentiviral vectors / M. C. Milone, U. O'Doherty // *Leukemia*. – 2018. – Vol. 32. – № 7. – P. 1529-1541. – DOI 10.1038/s41375-018-0106-0.
165. Efficient and Robust NK-Cell Transduction With Baboon Envelope Pseudotyped Lentivector / A. B. L. Colamartino, W. Lemieux, P. Bifsha [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 2873. – DOI 10.3389/fimmu.2019.02873.
166. Gutierrez-Guerrero, A. Lentiviral Vector Pseudotypes: Precious Tools to Improve Gene Modification of Hematopoietic Cells for Research and Gene Therapy / A. Gutierrez-Guerrero, F. L. Cosset, E. Verhoeven // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12. – № 9. – P. 1016. – DOI 10.3390/v12091016.
167. A Distinct Subset of Highly Proliferative and Lentiviral Vector (LV)-Transducible NK Cells Define a Readily Engineered Subset for Adoptive Cellular Therapy / R. Bari,

M. Granzin, K. S. Tsang [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 2001. – DOI 10.3389/fimmu.2019.02001.

168. Use of protamine to augment adenovirus-mediated cancer gene therapy / Lanuti M., Kouri C. E., Force S. [et al.] // *Gene Therapy*. – 1999. – Vol. 6. – №9. – P. 1600. – DOI 10.1038/sj.gt.3300987.

169. Nasiri, F. Effects of polybrene and retronectin as transduction enhancers on the development and phenotypic characteristics of VHH-based CD19-redirected CAR T cells: a comparative investigation / F. Nasiri, S. Muhammadnejad, F. Rahbarizadeh // *Clinical and Experimental Medicine*. – 2023. – Vol. 23. – № 6. – P. 2535-2549. – DOI 10.1007/s10238-022-00928-8.

170. Dextran Enhances the Lentiviral Transduction Efficiency of Murine and Human Primary NK Cells / A. Nanbakhsh, B. Best, M. Riese [et al.] // *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. – 2018. – № 131. – P. 55063. – DOI 10.3791/55063.

171. High-throughput screening identifies compounds that enhance lentiviral transduction / J. M. Johnston, G. Denning, R. Moot [et al.] // *Gene Therapy*. – 2014. – Vol. 21. – № 12. – P. 1008-1020. – DOI 10.1038/gt.2014.80.

172. Rapamycin relieves lentiviral vector transduction resistance in human and mouse hematopoietic stem cells / C. X. Wang, B. D. Sather, X. Wang [et al.] // *Blood*. – 2014. – Vol. 124. – № 6. – P. 913-923. – DOI 10.1182/blood-2013-12-546218.

173. Cyclosporin a and rapamycin relieve distinct lentiviral restriction blocks in hematopoietic stem and progenitor cells / C. Petrillo, D. Cesana, F. Piras [et al.] // *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. – 2015. – Vol. 23. – № 2. – P. 352-362. – DOI 10.1038/mt.2014.193.

174. Vectofusin-1 Improves Transduction of Primary Human Cells with Diverse Retroviral and Lentiviral Pseudotypes, Enabling Robust, Automated Closed-System Manufacturing / Radek C., Bernadin O., Drechsel K. [et al.] // *Human Gene Therapy*. – 2019. – Vol. 30. – № 12. – P. 1477-1493. – DOI 10.1089/hum.2019.157.

175. Rajabzadeh, A. Spinoculation and retronectin highly enhance the gene transduction efficiency of Mucin-1-specific chimeric antigen receptor (CAR) in human primary T

- cells / Rajabzadeh A., Hamidieh A. A., Rahbarizadeh F. // *BMC Molecular and Cell Biology*. – 2021. – Vol. 22. – № 1. – P. 57. – DOI 10.1186/s12860-021-00397-z.
176. IL-12-producing monocytes and HLA-E control HCMV-driven NKG2C⁺ NK cell expansion / A. Rölle, J. Pollmann, E.-M. Ewen [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2014. – Vol. 124. – № 12. – P. 5305-5316. – DOI 10.1172/JCI77440.
177. A Simple and Robust Single-Step Method for CAR-V δ 1 $\gamma\delta$ T Cell Expansion and Transduction for Cancer Immunotherapy / G. M. Ferry, C. Agbuduwe, M. Forrester [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 863155. – DOI 10.3389/fimmu.2022.863155.
178. Clinical-grade, large-scale, feeder-free expansion of highly active human natural killer cells for adoptive immunotherapy using an automated bioreactor / T. Sutlu, B. Stellan, M. Gilljam [et al.] // *Cytherapy*. – 2010. – Vol. 12. – № 8. – P. 1044-1055. – DOI 10.3109/14653249.2010.504770.
179. Natural Killer T Cells in Various Mouse Models of Hepatitis / J. Guan, G. Wang, Q. Yang [et al.] // *BioMed Research International*. – 2021. – Vol. 2021. – P. 1782765. – DOI 10.1155/2021/1782765.
180. Expansion of NK cells by engineered K562 cells co-expressing 4-1BBL and mMICA, combined with soluble IL-21 / B. Jiang, X. Wu, X. N. Li [et al.] // *Cellular Immunology*. – 2014. – Vol. 290. – № 1. – P. 10-20. – DOI 10.1016/j.cellimm.2014.04.011.
181. Goodier, M. R. Lipopolysaccharide stimulates the proliferation of human CD56⁺CD3⁻ NK cells: a regulatory role of monocytes and IL-10 / M. R. Goodier, M. Londei // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 2000. – Vol. 165. – № 1. – P. 139-147. – DOI 10.4049/jimmunol.165.1.139.
182. Optimization of In Vitro Expansion and Activation of Human Natural Killer Cells against Breast Cancer Cell Line / F. Peighambarzadeh, A. Najafalizadeh, N. Esmaeil [et al.] // *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. – 2020. – Vol. 12. – № 1. – P. 17-23.

183. Large-scale generation of natural killer lymphocytes for clinical application / J. Luhm, J. M. Brand, P. Koritke [et al.] // *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*. – 2002. – Vol. 11. – № 4. – P. 651-657. – DOI 10.1089/15258160260194794.
184. Perspectives for the Use of Fucoidans in Clinical Oncology / M. V. Kiselevskiy, N. Y. Anisimova, N. E. Ustyuzhanina [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 19. – P. 11821. – DOI 10.3390/ijms231911821.
185. Anti-Cancer Potential of Transiently Transfected HER2-Specific Human Mixed CAR-T and NK Cell Populations in Experimental Models: Initial Studies on Fucosylated Chondroitin Sulfate Usage for Safer Treatment / I. O. Chikileva, A. V. Bruter, P. O. Fedorova [et al.] // *Biomedicines*. – 2023. – Vol. 11. – № 9. – P. 2563-2585. – DOI 10.3390/biomedicines11092563.
186. Chondroitin Sulfate and Fucosylated Chondroitin Sulfate as Stimulators of Hematopoiesis in Cyclophosphamide-Induced Mice / N. E. Ustyuzhanina, N. Y. Anisimova, M. I. Bilan [et al.] // *Pharmaceuticals*. – 2021. – Vol. 14. – № 11. – P. 1074. – DOI 10.3390/ph14111074.
187. Clinical grade purification and expansion of NK cell products for an optimized manufacturing protocol / U. Koehl, C. Brehm, S. Huenecke [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2013. – Vol. 3. – P. 118. – DOI 10.3389/fonc.2013.00118.
188. IL-15 activates mTOR and primes stress-activated gene expression leading to prolonged antitumor capacity of NK cells / Y. Mao, V. van Hoef, X. Zhang [et al.] // *Blood*. – 2016. – Vol. 128. – № 11. – P. 1475-1489. – DOI 10.1182/blood-2016-02-698027.
189. Continuous treatment with IL-15 exhausts human NK cells via a metabolic defect / M. Felices, A. J. Lenvik, R. McElmurry [et al.] // *JCI insight*. – 2018. – Vol. 3. – № 3. – P. 96219. – DOI 10.1172/jci.insight.96219.
190. IL-21 Enhances Natural Killer Cell Response to Cetuximab-Coated Pancreatic Tumor Cells / E. L. McMichael, A. C. Jaime-Ramirez, K. D. Guenterberg [et al.] // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2017. – Vol. 23. – № 2. – P. 489-502. – DOI 10.1158/1078-0432.CCR-16-0004.

191. Donor-derived natural killer cells infused after human leukocyte antigen-haploidentical hematopoietic cell transplantation: a dose-escalation study / I. Choi, S. R. Yoon, S.-Y. Park [et al.] // *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. – 2014. – Vol. 20. – № 5. – P. 696-704. – DOI 10.1016/j.bbmt.2014.01.031.
192. The Synergistic Use of IL-15 and IL-21 for the Generation of NK Cells From CD3/CD19-Depleted Grafts Improves Their ex vivo Expansion and Cytotoxic Potential Against Neuroblastoma: Perspective for Optimized Immunotherapy Post Haploidentical Stem Cell Transplantation / A. Heinze, B. Grebe, M. Bremm [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 2816. – DOI 10.3389/fimmu.2019.02816.
193. Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18 / J. Chaix, M. S. Tessmer, K. Hoebe [et al.] // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 2008. – Vol. 181. – № 3. – P. 1627-1631. – DOI 10.4049/jimmunol.181.3.1627.
194. Cytokine-Induced Memory-Like NK Cells: From the Basics to Clinical Applications / I. Terrén, A. Orrantia, G. Astarloa-Pando [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 884648. – DOI 10.3389/fimmu.2022.884648.
195. Natural Killer Cell Expansion with Autologous Feeder Layer and Anti-CD3 Antibody for Immune Cell Therapy of Hepatocellular Carcinoma / F. Hosseinzadeh, J. Ai, S. Ebrahimi-Barough [et al.] // *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. – 2019. – Vol. 20. – № 12. – P. 3797-3803. – DOI 10.31557/APJCP.2019.20.12.3797.
196. Good manufacturing practice-compliant cell sorting and large-scale expansion of single KIR-positive alloreactive human natural killer cells for multiple infusions to leukemia patients / U. Siegler, S. Meyer-Monard, S. Jörger [et al.] // *Cytotherapy*. – 2010. – Vol. 12. – № 6. – P. 750-763. – DOI 10.3109/14653241003786155.
197. NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development / S. Liu, V. Galat, Y. Galat [et al.] // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2021. – Vol. 14. – № 1. – P. 7. – DOI 10.1186/s13045-020-01014-w.
198. Full article: Highly efficient IL-21 and feeder cell-driven ex vivo expansion of human NK cells with therapeutic activity in a xenograft mouse model of melanoma /

- Granzin M., Stojanovic A., Miller M. [et al.] // *Oncoimmunology*. – 2016. – Vol. 5. – № 9. – P. 1219007. – DOI 10.1080/2162402X.2016.1219007.
199. Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development / M. Malm, R. Saghaleyni, M. Lundqvist [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 18996. – DOI 10.1038/s41598-020-76137-8.
200. Leukemic priming of resting NK cells is killer Ig-like receptor independent but requires CD15-mediated CD2 ligation and natural cytotoxicity receptors / M. Sabry, M. Tsirogianni, I. A. Bakhsh [et al.] // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 2011. – Vol. 187. – № 12. – P. 6227-6234. – DOI 10.4049/jimmunol.1101640.
201. Generation of highly cytotoxic natural killer cells for treatment of acute myelogenous leukemia using a feeder-free, particle-based approach / J. L. Oyer, R. Y. Igarashi, A. R. Kulikowski [et al.] // *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. – 2015. – Vol. 21. – № 4. – P. 632-639. – DOI 10.1016/j.bbmt.2014.12.037.
202. CAR T Cells Administered in Combination with Lymphodepletion and PD-1 Inhibition to Patients with Neuroblastoma / A. Heczey, C. U. Louis, B. Savoldo [et al.] // *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. – 2017. – Vol. 25. – № 9. – P. 2214-2224. – DOI 10.1016/j.ymthe.2017.05.012.
203. CAR-NK cell in cancer immunotherapy; A promising frontier / F. Marofi, O. F. Abdul-Rasheed, H. S. Rahman [et al.] // *Cancer Science*. – 2021. – Vol. 112. – № 9. – P. 3427-3436. – DOI 10.1111/cas.14993.
204. Khawar, M. B. CAR-NK Cells: From Natural Basis to Design for Kill / M. B. Khawar, H. Sun // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 707542. – DOI 10.3389/fimmu.2021.707542.
205. Nanoparticle-Mediated Intracellular Protection of Natural Killer Cells Avoids Cryoinjury and Retains Potent Antitumor Functions / Yao X., Jovevski J. J., Todd M. F. [et al.] // *Advanced Science*. – 2020. – Vol. 7. – № 9. – P. 1902938. – DOI 10.1002/advs.201902938.
206. Structure and biological activity of a fucosylated chondroitin sulfate from the sea cucumber *Cucumaria japonica* / N. E. Ustyuzhanina, M. I. Bilan, A. S. Dmitrenok [et

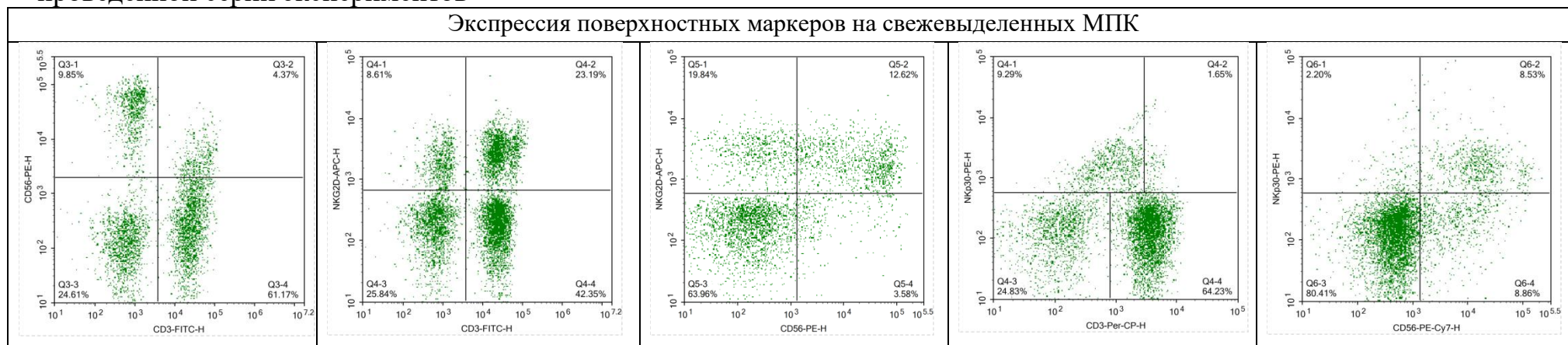
- al.] // *Glycobiology*. – 2016. – Vol. 26. – № 5. – P. 449-459. – DOI 10.1093/glycob/cwv119.
207. Interleukin-21 engineering enhances NK cell activity against glioblastoma via CEBPD / M. Shanley, M. Daher, J. Dou [et al.] // *Cancer Cell*. – 2024. – Vol. 42. – № 8. – P. 1450-1466.e11. – DOI 10.1016/j.ccell.2024.07.007.
208. Трошина, Е. А. Роль цитокинов в процессах адаптивной интеграции иммунных и нейроэндокринных реакций организма / Е. А. Трошина // *Проблемы Эндокринологии*. – 2021. – Т. 67. – № 2. – С. 4-9. – DOI 10.14341/probl12744.
209. IL-21-armored B7H3 CAR-iNKT cells exert potent antitumor effects / Y. Liu, Y. Dang, C. Zhang [et al.] // *iScience*. – 2024. – Vol. 27. – № 1. – P. 108597. – DOI 10.1016/j.isci.2023.108597.
210. Фёдорова, П. О. Оценка воздействия различных комбинаций интерлейкинов на пролиферацию и цитотоксичность клеток – натуральных киллеров / П. О. Фёдорова, И. О. Чикилева // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2025. – Т. 24. – № 2. – С. 22-31. – DOI 10.17650/1726-9784-2025-24-2-22-31.
211. Species comparison: human and minipig PBMC reactivity under the influence of immunomodulating compounds in vitro / C. P. S. Pernold, E. Lagumdzic, M. Stadler [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1327776. – DOI 10.3389/fimmu.2023.1327776.
212. CAR-T Cells with Phytohemagglutinin (PHA) Provide Anti-Cancer Capacity with Better Proliferation, Rejuvenated Effector Memory, and Reduced Exhausted T Cell Frequencies / G. Gulden, B. Sert, T. Teymur [et al.] // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11. – № 2. – P. 313. – DOI 10.3390/vaccines11020313.
213. Особенности экспансии и иммунофенотипа первичной культуры НК- и НКТ-клеток человека под действием различных активаторов пролиферации / П. О. Фёдорова, И. О. Чикилева, А. И. Токатлы [и др.] // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2025. – Т. 24. – № 4. – С. 64-76. – DOI 10.17650/1726-9784-2025-24-4-64-76.

214. Mechanisms of NK cell activation: CD4(+) T cells enter the scene / F. Bihl, C. Germain, C. Luci, V. M. Braud // Cellular and molecular life sciences: CMLS. – 2011. – Vol. 68. – № 21. – P. 3457-3467. – DOI 10.1007/s00018-011-0796-1.
215. Tumor immunity against a simian virus 40 oncoprotein requires CD8+ T lymphocytes in the effector immune phase / D. B. Lowe, M. H. Shearer, C. A. Jumper [et al.] // Journal of Virology. – 2010. – Vol. 84. – № 2. – P. 883-893. – DOI 10.1128/JVI.01512-09.
216. Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis / A. Schietinger, M. Philip, V. E. Krisnawan [et al.] // Immunity. – 2016. – Vol. 45. – № 2. – P. 389-401. – DOI 10.1016/j.immuni.2016.07.011.
217. Использование клеточной линии НЕК 293Т в качестве активатора пролиферации НК-клеток в контексте разработки CAR-NK-терапии / П. О. Фёдорова, И. О. Чикилева, М.В. Киселевский // Инфекция и иммунитет. – 2025. – Т. 15. – № 5. – С. 855–870. – DOI 10.15789/2220-7619- CNT-17941.
218. Transfection methods for high-throughput cellular assays of voltage-gated calcium and sodium channels involved in pain / M. M. Hasan, L. Ragnarsson, F. C. Cardoso [et al.] // PloS One. – 2021. – Vol. 16. – № 3. – P. e0243645. – DOI 10.1371/journal.pone.0243645.
219. An optimized method for high-titer lentivirus preparations without ultracentrifugation / W. Jiang, R. Hua, M. Wei [et al.] // Scientific Reports. – 2015. – Vol. 5. – P. 13875. – DOI 10.1038/srep13875.
220. A lentiviral vector for the production of T cells with an inducible transgene and a constitutively expressed tumour-targeting receptor / P. Reichenbach, G. M. P. Giordano Attianese, K. Ouchen [et al.] // Nature Biomedical Engineering. – 2023. – Vol. 7. – № 9. – P. 1063-1080. – DOI 10.1038/s41551-023-01013-5.
221. Brown, L. Y. An Improved Protocol for the Production of Lentiviral Vectors / L. Y. Brown, W. Dong, B. Kantor // STAR protocols. – 2020. – Vol. 1. – № 3. – P. 100152. – DOI 10.1016/j.xpro.2020.100152.

222. Dan, L. Optimizing viral transduction in immune cell therapy manufacturing: key process design considerations / L. Dan, L. Kang-Zheng // *Journal of Translational Medicine*. – 2025. – Vol. 23. – P. 501. – DOI 10.1186/s12967-025-06524-0.
223. Coroadinha, A. S. Host Cell Restriction Factors Blocking Efficient Vector Transduction: Challenges in Lentiviral and Adeno-Associated Vector Based Gene Therapies / A. S. Coroadinha // *Cells*. – 2023. – Vol. 12. – № 5. – P. 732. – DOI 10.3390/cells12050732.
224. Dan, L. Optimizing viral transduction in immune cell therapy manufacturing: key process design considerations / Dan L., Kang-Zheng L. // *Journal of Translational Medicine*. – 2025. – Vol. 23. – № 1. – P. 501. – DOI 10.1186/s12967-025-06524-0.
225. Imbalanced signal transduction in regulatory T cells expressing the transcription factor FoxP3 / D. Yan, J. Farache, M. Mingueneau [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2015. – Vol. 112. – № 48. – P. 14942-14947. – DOI 10.1073/pnas.1520393112.
226. Phase separation of signaling molecules promotes T cell receptor signal transduction / X. Su, J. A. Ditlev, E. Hui [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2016. – Vol. 352. – № 6285. – P. 595-599. – DOI 10.1126/science.aad9964.
227. Оптимизация метода лентивирусной трансдукции с целью получения CAR-лимфоцитов / П. О. Фёдорова, И. О. Чикилева, Н. А. Персиянцева [и др.] // *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. – 2025. – № 3. – С. 29-39. – DOI 10.14427/jipai.2025.3.29.
228. Methyl butyrate attenuates concanavalin A-induced autoimmune hepatitis by inhibiting Th1-cell activation and homing to the liver / J. Yang, W. Xie, K. Yu [et al.] // *Cellular Immunology*. – 2022. – Vol. 378. – P. 104575. – DOI 10.1016/j.cellimm.2022.104575.
229. Fucosylated Chondroitin Sulfates with Rare Disaccharide Branches from the Sea Cucumbers *Psolus peronii* and *Holothuria nobilis*: Structures and Influence on Hematopoiesis / N. E. Ustyuzhanina, M. I. Bilan, N. Yu. Anisimova [et al.] // *Pharmaceuticals*. – 2023. – Vol. 16. – № 12. – P. 1673. – DOI 10.3390/ph16121673.

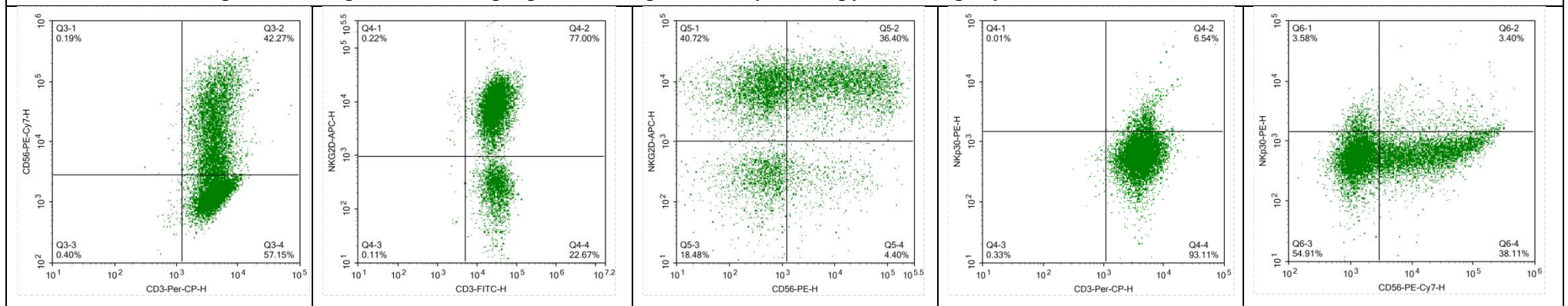
ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1 – Экспрессия поверхностных маркеров на культивируемых лимфоцитах в зависимости от интерлейкинов, находящихся в питательной среде. Результаты представлены по единичному донору и отражают средние значения для проведенной серии экспериментов

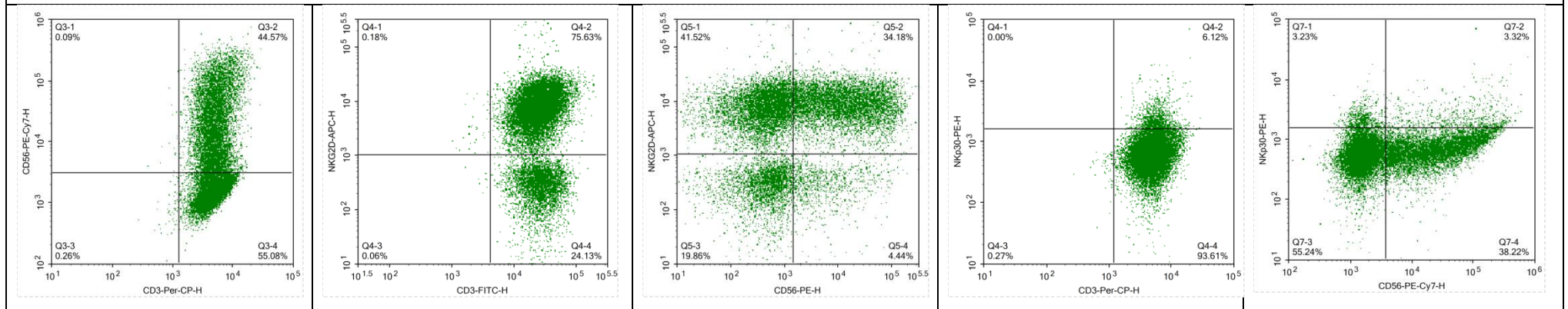


Продолжение таблицы А.1

Экспрессия поверхностных маркеров на лимфоцитах, культивируемых в присутствии ИЛ-2, 21-й день исследования



Экспрессия поверхностных маркеров на лимфоцитах, культивируемых в присутствии ИЛ-2+ИЛ-15, 21-й день исследования



Продолжение таблицы А.1

Экспрессия поверхностных маркеров на лимфоцитах, культивируемых в присутствии ИЛ-2+ИЛ-15+ИЛ-21, 21-й день исследования

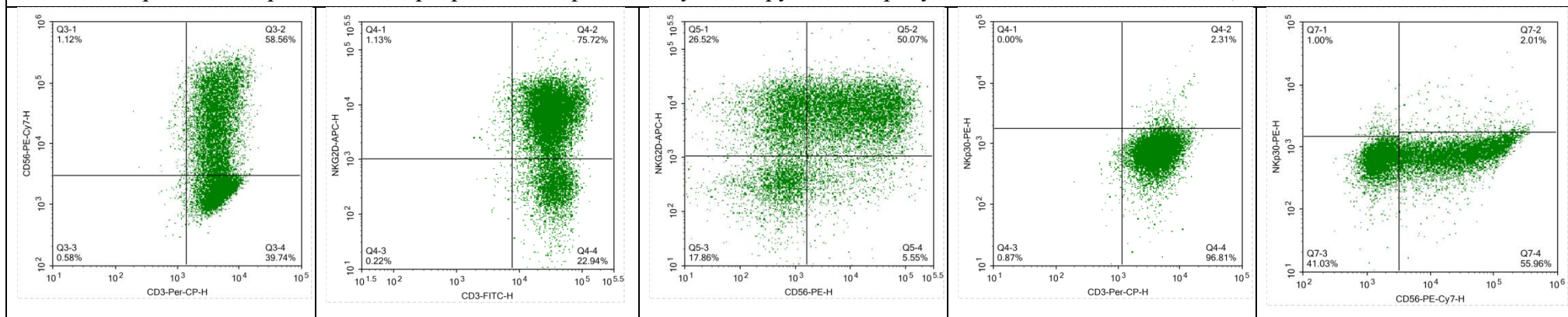


Таблица А.2 – Оценка популяционного состава культивируемых лимфоцитов и экспрессии поверхностных маркеров при культивировании с добавлением различных цитокинов

Показатель	День культивирования			
	1-й	7-й	14-й	21-й
	МПК до активации	Культивирование в присутствии ИЛ-2		
Доля CD3+CD56- клеток, %	61,2±5,2	94,5±5,5	76,8±6,2	57,2±6,1
Доля CD3+CD4+ клеток, %	41,6±4,8	47,8±3,8	30,0±3,1	24,0±2,2
Доля CD3+CD8+ клеток, %	24,8±7,1	48,0±5,1	64,6±5,2	69,7±6,7
Иммунорегуляторный индекс	1,7±0,2	1,0±0,1	0,5±0,2	0,3±0,1
Доля CD56+ клеток, %	14,5±4,2	5,3±0,8	22,3±2,1	42,5±4,1
Доля CD3-CD56+ клеток, %	9,9±3,3	0,2±0,1	0,2±0,1	0,2±0,1
Доля CD3+CD56+ клеток, %	4,4±1,9	5,3±0,7	22,1±3,3	42,3±3,8
Доля NKG2D+ клеток, %	31,6±3,8	50,1±4,6	67,3±6,6	77,2±7,2
Доля CD56+NKG2D+ клеток, %	12,6±1,1	2,8±0,5	14,8±2,0	36,4±3,5
Доля CD3+NKG2D+клеток, %	23,2±2,5	49,9±3,6	66,4±5,4	77,0±7,4
Доля NKp30+ клеток, %	10,2±1,1	10,1±1,2	10,2±1,1	6,5±0,8
Доля CD56+NKp30+ клеток, %	8,5±0,9	1,7±0,4	3,8±0,5	3,4±0,5
Доля CD3+NKp30+ клеток, %	1,7±0,3	10,1±0,9	10,2±1,3	6,5±0,9
Доля CD16+ клеток, %	7,2±1,4	0,3±0,1	0,3±0,1	0,5±0,1
			Культивирование в присутствии ИЛ-2, ИЛ-15	
Доля CD3+CD56- клеток, %	61,2±5,2	95,0±4,9	85,3±7,9	55,1±6,1
Доля CD3+CD4+ клеток, %	41,6±4,8	53,7±4,9	30,3±3,2	24,0±2,2
Доля CD3+CD8+ клеток, %	24,8±7,1	44,1±3,7	66,1±6,2	68,8±5,9
Иммунорегуляторный индекс	1,7±0,2	1,2±0,8	0,5±0,1	0,4±0,1
Доля CD56+ клеток, %	14,5±4,2	5,0±0,6	23,2±2,1	44,6±3,7

Продолжение таблицы А.2

Показатель	День культивирования			
	1-й	7-й	14-й	21-й
	МПК до активации	Культивирование в присутствии ИЛ-2, ИЛ-15		
Доля CD3-CD56+ клеток, %	9,9±3,3	0,4±0,2	0,8±0,1	0,1±0,1
Доля CD3+CD56+ клеток, %	4,4±1,9	4,6±0,4	22,4±1,9	44,6±3,5
Доля NKG2D+ клеток, %	31,6±3,8	49,4±5,1	66,7±5,8	75,8±7,6
Доля CD56+NKG2D+ клеток, %	12,6±1,1	2,6±0,3	15,2±1,6	34,2±3,0
Доля CD3+NKG2D+клеток, %	23,2±2,5	48,3±4,7	67,0±6,5	75,6±7,1
Доля NKp30+ клеток, %	10,2±1,1	11,0±1,3	10,3±1,1	6,1±0,7
Доля CD56+NKp30+ клеток, %	8,5±0,9	1,7±0,2	4,3±0,5	3,3±0,4
Доля CD3+NKp30+ клеток, %	1,7±0,3	11,0±1,4	10,3±1,3	6,1±0,7
Доля CD16+ клеток, %	7,2±1,4	0,4±0,1	0,4±0,1	0,5±0,1
		Культивирование в присутствии ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-21		
Доля CD3+CD56- клеток, %	61,2±5,2	95,5±4,4	77,2±7,9	39,7±4,4
Доля CD3+CD4+ клеток, %	41,6±4,8	45,1±4,6	26,9±2,9	20,5±2,5
Доля CD3+CD8+ клеток, %	24,8±7,1	48,1±5	65,8±6,6	67,1±6,8
Иммунорегуляторный индекс	1,7±0,2	0,9±0,2	0,4±0,1	0,3±0,1
Доля CD56+ клеток, %	14,5±4,2	4,2±0,3	21,5±2,3	59,7±5,3
Доля CD3-CD56+ клеток, %	9,9±3,3	0,3±0,1	0,5±0,1	1,1±0,2
Доля CD3+CD56+ клеток, %	4,4±1,9	3,8±0,4	21,0±2,3	58,6±5,8
Доля NKG2D+ клеток, %	31,6±3,8	50,8±5,1	69,5±7,0	76,9±7,8
Доля CD56+NKG2D+ клеток, %	12,6±1,1	1,9±0,3	14,3±1,1	50,1±4,4
Доля CD3+NKG2D+клеток, %	23,2±2,5	45,0±5,2	69,3±6,6	75,7±7,4
Доля NKp30+ клеток, %	10,2±1,1	4,9±0,5	4,9±0,5	2,3±0,3
Доля CD56+NKp30+ клеток, %	8,5±0,9	0,8±0,1	2,4±0,3	2,0±0,2

Продолжение Таблицы А.2

Показатель	День культивирования			
	1-й	7-й	14-й	21-й
	МПК до активации	Культивирование в присутствии ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-21		
Доля CD3+NKp30+ клеток, %	1,7±0,3	4,9±0,5	4,9±0,5	2,3±0,3
Доля CD16+ клеток, %	7,2±1,4	1,1±0,2	0,3±0,1	0,4±0,1

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б.1 – Иммунофенотип первичной культуры лимфоцитов при длительной культивировании под воздействием различных активаторов пролиферации

Показатель	День культивирования							
	МПК до активации	Активация МАТ				Активация МАТ + FCS		
		1-й	3-й	11-й	21-й	3-й	11-й	21-й
Доля CD3+CD56- клеток, %	79,5±8,4	81,9±9,8	71,0±7,3	45,9±5,6	83,1±9,3	73,6±7,2	41,4±3,0	
Иммунорегуляторный индекс	1,9±0,1	1,9 ±0,3	0,6±0,2	0,2±0,2	1,9±0,2	0,4±0,1	0,1±0,0	
Доля CD56+ клеток, %	19,4±3,1	16,9±1,8	30,2±3,2	54,1±5,7	18,8±2,1	23,3±2,6	58,9±6,0	
Доля CD3-CD56+ клеток, %	13,1±2,9	12,6±2,8	3,9±0,6	2,0±0,4	13,1±1,4	4,2±0,5	1,8±0,3	
Доля CD3+CD56+ клеток, %	6,5±2,4	4,3±0,8	27,2±3,7	52,1±5,5	5,6±0,6	19,2±2,2	57,1±6,1	
Доля NKG2D+ клеток, %	29,3±3,3	26,1±3,0	69,8±8,1	82,7±8,3	23,7±2,6	65,8±6,7	84,3±7,9	
Доля CD56+NKG2D+ клеток, %	18,6±2,4	15,2±1,8	27,9±4,0	50,8±5,5	14,9±1,7	28,0±3,1	40,4±8,8	
Доля CD3+NKG2D+клеток, %	17,5±2,7	15,0±1,8	68,0±7,2	80,7±7,9	14,0±1,5	65,3±6,8	82,4±8,3	
Доля CD16+ клеток, %	17,7±2,4	13,2±2,2	2,0±0,3	7,3±0,8	12,9±1,5	1,5±0,4	6,8±0,7	
Доля CD3+CD16+ клеток, %	6,0±1,4	1,5±0,9	0,6±0,4	5,6±0,5	1,6±0,3	0,7±0,2	5,5±0,7	

Продолжение таблицы Б.1

Показатель	День культивирования							
	МПК до активации	Активация МАТ				Активация МАТ + FCS		
	1-й	3-й	11-й	21-й	3-й	11-й	21-й	
Доля CD56+CD16+ клеток, %	15,7±1,9	11,7±1,5	1,4±0,5	1,7±0,2	12,1±1,5	1,1±0,2	1,6±0,3	
	МПК до активации	Активация L-ФГА				Активация КонА		
	1-й	3-й	11-й	21-й	3-й	11-й	21-й	
Доля CD3+CD56- клеток, %	79,5±8,4	80,8±8,2	93,0±6,4	85,8±8,8	71,8±7,7	76,0±7,8	79,9±8,1	
Иммунорегуляторный индекс	1,9±0,1	1,9±0,2	0,9±0,2	0,5±0,1	1,9±0,3	1,7±0,2	1,4±0,2	
Доля CD56+ клеток, %	19,4±3,1	17,4±1,8	5,2±0,7	11,5±1,4	18,5±1,9	10,4±1,3	19,5±2,1	
Доля CD3-CD56+ клеток, %	13,1±2,9	13,2±1,6	2,4±0,3	6,1±0,9	12,8±1,5	3,5±0,4	5,7±0,7	
Доля CD3+CD56+ клеток, %	6,5±2,4	4,2±0,7	2,8±0,4	5,5±0,8	5,7±0,6	6,9±0,8	13,8±1,5	
Доля NKG2D+ клеток, %	29,3±3,3	27,7±3,2	58,0±6,3	64,5±7,1	25,9±2,8	31,5±3,3	50,1±5,9	
Доля CD56+NKG2D+ клеток, %	18,6±2,4	16,7±1,9	7,6±0,9	13,5±1,6	17,4±1,6	9,9±1,2	21,5±2,4	
Доля CD3+NKG2D+клеток, %	17,5±2,7	15,0±1,7	55,4±6,1	57,4±6,1	16,3±1,7	28,5±2,6	44,6±4,8	
Доля CD16+ клеток, %	17,7±2,4	10,7±1,5	2,2±0,4	6,9±0,7	10,4±1,2	3,0±0,4	4,1±0,6	

Продолжение таблицы Б.1

Показатель	День культивирования							
	МПК до активации	Активация L-ФГА				Активация КоА		
		1-й	3-й	11-й	21-й	3-й	11-й	21-й
Доля CD3+CD16+ клеток, %	6,0±1,4	4,8±0,5	0,2±0,2	0,9±0,2	0,7±0,3	0,4±0,1	0,4±0,2	
Доля CD56+CD16+ клеток, %	15,7±1,9	6,0±0,7	2,0±0,4	6,0±0,7	9,7±1,1	2,5±0,3	3,7±0,6	

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Таблица В.1 – Экспрессия поверхностных маркеров культивируемых лимфоцитов при дополнительной стимуляции клеточной линией НЕК 293Т на 8-й день культивирования

Показатель	День культивирования				
	МПК до активации	Активация МАТ однократно в начале культивирования		Активация МАТ + стимуляция культурой НЕК 293Т на 8-й день культивирования	
		1-й	14-й	21-й	14-й
Доля CD3-CD56+ клеток, %	18,2±2,5	6,9±0,8	3,6±0,5	15,2±1,7	5,4±0,8
Доля CD3+CD56+ клеток, %	6,0±0,9	39,0±4,2	73,5±7,5	44,4±4,6	68,6±7,1
Доля CD3+CD56- клеток, %	59,9±6,1	45,2±4,8	21,5±2,5	36,7±3,5	23,9±2,6
Иммунорегуляторный индекс	1,6±0,2	0,7±0,4	0,4±0,3	1,2±0,3	0,4±0,2
Доля CD56+CD8+ клеток, %	5,5±0,6	40,9±3,9	52,0±5,8	39,9±4,0	48,5±4,9
Доля CD56+CD4+ клеток, %	0,5±0,3	1,7±1,8	1,0±0,6	7,5±0,9	1,1±0,6
Доля NKG2D+ клеток, %	38,9±4,0	88,1±9,1	92,4±7,9	86,4±8,2	96,6±3,1
Доля CD56+NKG2D+ клеток, %	22,2±2,4	50,1±5,2	72,6±7,5	43,0±4,5	73,0±7,4
Доля NKp30+ клеток, %	15,5±1,7	23,9±2,8	6,2±0,8	27,2±2,9	7,2±0,8
Доля CD56+NKp30+ клеток, %	14,1±1,3	17,7±1,9	6,8±0,8	25,7±2,6	8,1±0,9

Продолжение таблицы В.1

Показатель	День культивирования				
	МПК до активации	Активация МАТ однократно в начале культивирования		Активация МАТ + стимуляция культурой НЕК 293Т на 8-й день культивирования	
		1-й	14-й	21-й	14-й
Доля CD16+ клеток, %	22,1±3,2	9,0±1,1	6,1±0,9	22,1±2,6	17,3±1,8
Доля CD56+CD16+ клеток, %	16,7±1,9	7,8±1,4	5,8±1,1	20,3±3,0	15,0±1,8

Таблица В.2 – Экспрессия поверхностных маркеров культивируемых лимфоцитов при дополнительной стимуляции клеточной линией НЕК 293Т на 15-й день культивирования

Показатель	День культивирования		
	МПК до активации	Активация МАТ однократно в начале культивирования	Активация МАТ + стимуляция культурой НЕК 293Т на 15-й день культивирования
		1-й	21-й
Доля CD3-CD56+ клеток, %	18,2±2,5	3,6±0,5	6,6±0,6
Доля CD3+CD56+ клеток, %	5,5±0,9	73,5±7,5	69,9±7,2
Доля CD3+CD56- клеток, %	59,9±6,1	21,5±2,5	20,6±2,1
Иммунорегуляторный индекс	1,6±0,2	0,4±0,3	1,8±0,3
Доля CD56+CD8+ клеток, %	5,5±0,6	52,0±5,8	47,3±5,5
Доля CD56+CD4+ клеток, %	0,5±0,3	1,0±0,6	6,4±0,7
Доля NKG2D+ клеток, %	38,9±4,0	92,4±7,9	93,8±6,1
Доля CD56+NKG2D+ клеток, %	22,2±2,4	72,6±7,5	72,8±6,9
Доля НКp30+ клеток, %	15,5±1,7	6,2±0,8	25,8±2,8
Доля CD56+НКp30+ клеток, %	14,1±1,3	6,8±0,8	25,0±2,7

Продолжение таблицы В.2

Показатель	День культивирования		
	МПК до активации	Активация МАТ однократно в начале культивирования	Активация МАТ + стимуляция культурой НЕК 293Т на 15-й день культивирования
			21-й
Доля CD16+ клеток, %	22,1±3,2	6,1±0,9	19,2±2,3
Доля CD56+CD16+ клеток, %	16,7±1,9	5,8±1,1	17,2±1,9

Таблица В.3 – Экспрессия поверхностных маркеров культивируемых лимфоцитов при дополнительной стимуляции клеточной линией НЕК 293Т на 8-й и 15-й день культивирования

Показатель	День культивирования				
	МПК до активации	Активация МАТ однократно в начале культивирования		Активация МАТ + стимуляция культурой НЕК 293Т на 8-й и 15-й день культивирования	
		1-й	14-й	21-й	14-й
Доля CD3-CD56+ клеток, %	18,2±2,5	6,9±0,8	3,6±0,5	15,2±1,7	8,2±0,7
Доля CD3+CD56+ клеток, %	5,5±0,9	39,0±4,2	73,5±7,5	44,4±4,6	66,1±6,8
Доля CD3+CD56- клеток, %	59,9±6,1	45,2±4,8	21,5±2,5	36,7±3,5	24,2±4,6
Иммунорегуляторный индекс	1,6±0,2	0,7±0,4	0,4±0,3	1,2±0,3	0,4±0,2
Доля CD56+CD8+ клеток, %	5,5±0,6	40,9±3,9	52,0±5,8	39,9±4,0	27,1±3,3
Доля CD56+CD4+ клеток, %	0,5±0,3	1,7±1,8	1,0±0,6	7,5±7,2	49,6±5,8
Доля NKG2D+ клеток, %	38,9±4,0	88,1±9,1	92,4±7,9	86,4±8,2	94,7±5,2
Доля CD56+NKG2D+ клеток, %	22,2±2,4	50,1±5,2	72,6±7,5	43,0±4,5	85,3±8,6
Доля NKp30+ клеток, %	15,5±1,7	23,9±2,8	6,2±0,8	27,2±2,9	58,8±6,1
Доля CD56+NKp30+ клеток, %	14,1±1,3	17,7±1,9	6,8±0,8	25,7±2,6	57,1±5,9
Доля CD16+ клеток, %	22,0±3,2	9,0±1,1	6,1±0,9	20,3±3,0	55,1±5,8

Продолжение таблицы В.3

Показатель	День культивирования				
	МПК до активации	Активация МАТ однократно в начале культивирования		Активация МАТ + стимуляция культурой НЕК 293Т на 8-й и 15-й день культивирования	
		1-й	14-й	21-й	14-й
Доля CD56+CD16+ клеток, %	16,7±1,9	7,8±1,4	5,8±1,1	22,1±2,6	54,7±5,7

Таблица В.4 – Экспрессия поверхностных маркеров культивируемых лимфоцитов после стимуляции клеточной линией НЕК 293Т, проводимой однократно в начале культивирования

Показатель	День культивирования						
	МПК до активации	Активация МАТ однократно в начале культивирования			Активация НЕК 293Т однократно в начале культивирования		
		1-й	4-й	11-й	14-й	4-й	11-й
Доля CD3-CD56+ клеток, %	19,3 ± 2,1	14,7 ± 1,7	7,7 ± 0,9	6,0 ± 0,8	43,3 ± 4,4	27,3 ± 2,8	29,2 ± 3,1
Доля CD3+CD56+ клеток, %	3,5 ± 0,5	8,3 ± 0,9	41,7 ± 4,4	69,0 ± 7,2	17,1 ± 1,9	25,0 ± 2,8	45,8 ± 4,8
Доля CD3+CD56- клеток, %	52,2 ± 5,6	63,8 ± 6,5	57,5 ± 6	36,1 ± 3,8	25,9 ± 2,5	45,9 ± 4,7	18,3 ± 2,1
Иммунорегуляторный индекс	1,6 ± 0,2	1,4 ± 0,2	0,7 ± 0,3	0,4 ± 0,1	6,0 ± 0,7	3,4 ± 0,6	3,4 ± 0,5
Доля CD56+CD8+ клеток, %	2,9 ± 0,4	7,3 ± 0,9	33,1 ± 3,6	57,6 ± 5,8	20,3 ± 2,5	13,1 ± 1,7	6,3 ± 0,8
Доля CD56+CD4+ клеток, %	0,8 ± 0,2	2,9 ± 0,3	3,0 ± 0,4	2,6 ± 0,4	22,0 ± 2,6	45,1 ± 4,4	57,8 ± 5,9
Доля CD56+NKG2D+ клеток, %	20,3 ± 2,2	29,1 ± 3,1	41,5 ± 4,4	62,7 ± 6,5	45,2 ± 4,8	63,9 ± 6,6	74,7 ± 7,6
Доля CD56+NKp30+ клеток, %	15,5 ± 1,7	13,6 ± 1,5	11,6 ± 1,4	8,0 ± 0,9	39,5 ± 4,1	48,5 ± 5,3	54,1 ± 5,6
Доля CD56+CD16+ клеток, %	17,2 ± 1,9	16,3 ± 1,8	7,4 ± 0,9	4,9 ± 0,5	35,0 ± 3,8	40,1 ± 4,4	51,5 ± 5,7