

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

На правах рукописи

КУЗНЕЦОВА МАРИЯ СЕРГЕЕВНА

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ *IN*
VITRO-ГЕНЕРИРОВАННЫХ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ,
СПЕЦИФИЧНЫХ К ЭПИТОПАМ АНТИГЕНА HER2/NEU**

14.03.09 — “Клиническая иммунология, аллергология”

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.м.н., профессор С. В. Сенников

Новосибирск

2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Потенциал иммунной системы в борьбе с опухолью	13
1.2. Роль цитотоксических Т-лимфоцитов в противоопухолевом иммунном ответе	15
1.3. Дифференцировка и созревание цитотоксических Т-лимфоцитов	17
1.3.1. Наивные Т-лимфоциты.....	20
1.3.2. Субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови.....	22
1.3.3. Дополнительные субпопуляции Т-клеток памяти	23
1.4. Методы исследования популяций Т-клеток памяти	26
1.4.1. Идентификация антиген-специфичных Т-клеток с помощью МНС-мультимеров	27
1.5. Дендритные клетки	31
1.5.1. Иммунобиология дендритных клеток	31
1.5.2. Получение дендритных клеток <i>in vitro</i>	34
1.5.3. Методы <i>ex vivo</i> нагрузки дендритных клеток опухолевыми антигенами.....	36
1.6. Опухоль-ассоциированные антигены.....	38
1.6.1. Классификация опухоль-ассоциированных антигенов	39
1.6.2. Опухоль-ассоциированный антиген HER2/neu	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
2.1. Среда и реагенты	49
2.2. ДНК-конструкции	51
2.3. Объект исследования	51
2.4. Генотипирование для выявления аллеля HLA-A*02.....	54
2.5. Выделение мононуклеарных клеток из цельной периферической крови.	56
2.6. Получение прилипающей и неприлипающей фракций мононуклеарных клеток. Получение незрелых дендритных клеток из моноцитов прилипающей фракции МНК.....	56
2.6.1. Оптимизация метода выделения прилипающей фракции МНК.....	57
2.7. Трансфекция незрелых дендритных клеток. Стимуляция созревания трансфицированных дендритных клеток.....	59
2.8. Фенотипирование дендритных клеток и оценка их функциональной активности.....	60
2.9. Получение активированных HER2-специфичных Т-лимфоцитов	60
2.10. Окрашивание стрептамерами и идентификация HER2-специфичных Т-лимфоцитов	61
2.11. Фенотипирование цитотоксических Т-лимфоцитов.....	62
2.12. Изоляция HER2-специфичных Т-лимфоцитов.....	63
2.13. Стимуляция пролиферации HER2-специфичных Т-лимфоцитов и оценка эффективности магнитной сортировки	63
2.14. Оценка экспрессии гена <i>ErbB2</i> в клетках опухолевой линии MCF-7	65

2.15. Анализ цитотоксичности HER2-специфичных клеток.....	66
2.16. Определение концентрации IFN- γ в кондиционных средах	69
2.17. Методы статистической обработки	70
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	71
3.1. Оценка содержания HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови условно-здоровых доноров и пациентов с HER2-позитивным раком молочной железы.....	71
3.2. Разработка протокола получения HER2-специфичных Т-лимфоцитов.....	72
3.2.1. Оптимизация метода выделения прилипающей фракции моноклеарных клеток	72
3.2.2. Оценка эффективности доставки ДНК-конструкции в дендритные клетки методами магнитной трансфекции и нуклеофекции.....	74
3.2.3. Оценка фенотипа и функциональной активности полученных дендритных клеток	75
3.2.4. Оценка содержания HER2-специфичных Т-лимфоцитов в совместной культуре моноклеарных клеток и нагруженных антигеном дендритных клеток	79
3.2.5. Получение популяций цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам E75 и E88 антигена HER2/neu	81
3.2.6. Обогащение культуры отсортированных HER2-специфичных Т-лимфоцитов.....	83
3.2.7. Подбор клеток-мишеней для анализа специфического противоопухолевого клеточного иммунного ответа.....	84
3.3. Цитотоксические свойства HER2-специфичных Т-лимфоцитов	87
3.3.1. Анализ цитотоксичности HER2-специфичных Т-лимфоцитов против клеток линии MCF-7	87
3.3.2. Анализ продукции IFN- γ	90
3.4. Фенотипирование цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам HER2/neu	91
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
ВЫВОДЫ	114
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	117

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

По данным Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена в 2017 г. в России смертность от злокачественных новообразований составила 15,9% в общей структуре смертности, по-прежнему оставаясь второй по распространенности причиной после сердечно-сосудистых заболеваний [под ред. Каприна и др., 2018].

Хирургическое лечение, лучевая терапия и химиотерапия представляют собой три общепринятых метода лечения рака, которые позволяют эффективно элиминировать основную опухолевую массу за короткий срок, но не способны уничтожить все опухолевые клетки. Минимальная опухолевая нагрузка, сохраняющаяся после удаления основной части новообразования, лежит в основе существующей проблемы рецидивов опухолей и развития метастазов, приводящих к увеличению уровня смертности и инвалидизации среди онкологических пациентов [Tachtsidis et al., 2016].

В отношении данной проблемы традиционные методы лечения рака обнаруживают свою несостоятельность, и становится очевидной необходимость разработки новых подходов, направленных на уничтожение единичных опухолевых клеток, сохранившихся после удаления основной опухолевой массы.

Фундаментальные и клинические исследования последних лет подтверждают, что использование потенциала иммунной системы дает возможность эффективно уничтожать опухолевые клетки, несущие на своей поверхности опухолевые антигены [Cancer Immunotherapy, 2013; Sennikov et al., 2017; Ribatti, 2017; Aragon-Sanabria et al., 2018]. Цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) представляют собой центральное звено противоопухолевого антиген-специфического иммунитета, в связи с чем являются объектом пристального внимания исследователей, занимающихся иммунотерапией опухолевых заболеваний, и активно используются для адоптивного Т-клеточного переноса [de

Wolf et al., 2018]. Следует отметить, что преимущество adoptивного переноса аутологичных Т-лимфоцитов перед рядом других иммунотерапевтических подходов обусловлено тем, что аутологичные Т-клетки проходят стадии активации и наработки в условиях *ex vivo*, вне иммуносупрессирующего влияния опухоли, и лишь после этого возвращаются в кровоток пациенту. Интерес исследователей к ЦТЛ как к клеточному препарату для adoptивного переноса объясняется способностью данных клеток к непосредственной реализации механизмов цитотоксичности, к которым относится секреция эффекторных цитокинов — интерферона- γ (interferon- γ , IFN- γ), фактора некроза опухоли- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), секреция гранул перфорина и гранзима, а также FasL/TRAIL-опосредованный запуск клеточной гибели [Peters et al., 1991; Barry, Bleakly, 2002; Halle et al., 2017]. При этом в последние годы становится очевидным, что цитотоксичность эффекторных клеток не является исчерпывающим условием успешного устранения опухолевой нагрузки: эффективность Т-клеточной иммунотерапии также определяется способностью противоопухолевых клеток к длительному самоподдержанию в организме пациента. Показано, что уровень жизнеспособности и пролиферативной активности Т-клеток прямо коррелирует с противоопухолевой эффективностью adoptивной Т-клеточной терапии [Gattinoni et al., 2006; Hinrichs et al., 2006; June, 2007]. В связи с этим особую важность приобретает наличие Т-клеток памяти в популяциях противоопухолевых антиген-специфичных Т-лимфоцитов [Perret, Ronchese, 2008].

В научной литературе существует множество примеров использования аутологичных дендритных клеток, нагруженных опухолевыми антигенами, для стимуляции иммунного ответа в культуре моноклеарных клеток [Jeras et al., 2005; Boudreau et al., 2011; Курилин и др., 2013; Sennikov et al., 2016]. Традиционно после стимуляции дендритными клетками в качестве эффекторов против опухолевых клеток используется смешанная культура активированных моноклеарных клеток. Уровень цитотоксического действия на опухолевые клетки-мишени в такой культуре может быть снижен в связи с низким фактическим содержанием клеток-эффекторов, т.е. непосредственно CD8⁺ цитотоксических Т-

лимфоцитов из-за присутствия большого количества клеток других типов и функций (включая супрессорные клетки) в смешанной культуре моноклеарных клеток. Возможность выхода из данной ситуации появилась с развитием методов специфического окрашивания и выделения антиген-специфичных Т-лимфоцитов МНС-мультимерами. Так, технология обратимого окрашивания CD8⁺ Т-лимфоцитов человека HLA-стрептамерами позволяет выделять специфичные к конкретным антигенам Т-клетки с последующим эффективным удалением реагентов окрашивания с поверхности лимфоцитов, не влияя при этом на их жизнеспособность и функции. Использование функционально полноценных антиген-специфичных Т-лимфоцитов, выделенных по технологии стрептамеров, в качестве эффекторной популяции против опухолевых клеток, несущих опухолевый антиген, может способствовать получению более мощного цитотоксического эффекта по сравнению с цитотоксичностью смешанной культуры активированных моноклеарных клеток.

Помимо повышения чистоты популяций цитотоксических Т-клеток, современные методы многоцветной проточной цитометрии в сочетании с технологиями МНС-мультимеров позволяют не только идентифицировать и выделять популяции ЦТЛ, но также вести фенотипическое исследование уровня дифференцировки, функциональных особенностей данных клеток, и даже исследовать распределение субпопуляций Т-клеток памяти внутри популяций, специфичных к конкретным эпитопам опухолевых антигенов.

Опухоль-ассоциированный антиген HER2/neu (Human Epidermal-growth-factor receptor-2, HER2) входит в семейство рецепторов эпидермального фактора роста человека и обычно экспрессируется в процессе эмбриогенеза, но также присутствует на нормальных клетках органов взрослого организма [Gutierrez, Schiff, 2011; Wen, Hu, 2016]. Гиперэкспрессия HER2/neu, характерная для клеток различных видов злокачественных карцином, сделала его удобной мишенью для иммунотерапии. Для HER2/neu описан целый ряд иммуногенных эпитопов, способных инициировать выраженный специфический иммунный ответ, среди которых можно выделить, в частности, эпитопы E75 (HER2 369-377) и E88

(HER2 689-697), как наиболее эффективно представляемые в комплексе с молекулами HLA-A*0201 — аллелем, HLA класса I, характеризующийся встречаемостью в наибольшем количестве изученных человеческих популяций, а также наибольшей встречаемостью в европеоидной популяции [Middleton et al., 2000]. При этом в подавляющем большинстве опубликованных клинических испытаний используется пептид HER2/neu HER2 369-377 [Correa, Plunkett, 2001; Bernhard et al., 2008].

Основной локализацией HER2-гиперэкспрессирующих опухолей является молочная железа. Рак молочной железы остается ведущей онкопатологией у женского населения России на протяжении многих лет (21,1%), уровень смертности от которого занимает первое место (16,4%) [под ред. Каприна и др., 2018]. Среди выделяемых форм рака молочной железы HER2-позитивная форма считается наиболее агрессивной и ассоциирована с плохим клиническим прогнозом [Hamy et al., 2017].

В клинической практике разработан и применяется ряд антител и лекарственных препаратов, направленных на остановку пролиферативной активности клеток HER2-позитивных опухолей [Rongcun et al., 1999; Goebel et al., 2002; Bernhard et al., 2008; English et al., 2013; Максютлов и др., 2014; Eroglu et al., 2014]. Однако, несмотря на успешность многих подходов, экспрессия HER2/neu продолжает быть ассоциирована с ухудшением показателей выживаемости [Subbiah, Gonzalez-Angulo, 2013; Hamy et al., 2017]. Поэтому исследования, связанные с HER2/neu, не теряют своей актуальности [Grela-Wojewoda et al., 2015; Ahmed et al., 2015; Wen, Hu, 2016; Jiao et al., 2018].

Таким образом, разработка подхода, сочетающего технологию получения функционально активных цитотоксических Т-лимфоцитов, их выделения и наработки, с последующим адоптивным переносом полученных Т-клеток, позволит решить проблему устранения остаточной опухолевой нагрузки у пациентов с HER2-позитивными опухолями и высоким риском развития рецидивов.

Целью настоящей работы является получение популяций цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам E75 и E88 белка HER2 и оценка их противоопухолевой активности и субпопуляционного состава.

В соответствии с поставленной целью сформулированы следующие задачи:

1. Оценить содержание E75 и E88-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови условно-здоровых доноров и пациентов с HER2-позитивным раком молочной железы.
2. Разработать протокол получения *in vitro* антиген-специфичных Т-лимфоцитов с использованием дендритных клеток, трансфицированных плазмидой, кодирующей эпитопы белка HER2, технологии стрептамеров и магнитной сепарации.
3. Изучить цитотоксический эффект двух клонов Т-лимфоцитов, специфичных к разным эпитопам белка HER2 против опухолевых клеток *in vitro*.
4. Исследовать содержание Т-клеток памяти в популяциях E75- и E88-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов.

Научная новизна работы

Разработан протокол получения HER2-специфичных Т-лимфоцитов с использованием дендритных клеток, трансфицированных плазмидой, кодирующей иммуногенные эпитопы E75 и E88 белка HER2, магнитной сепарации HER2-специфичных ЦТЛ и наработки выделенных ЦТЛ с помощью цитокинов IL-2, IL-7, IL-15.

Показано наличие HER2-специфичных Т-лимфоцитов в крови условно-здоровых доноров и значимое большее содержание данных клеток в крови пациентов с HER2-гиперэкспрессирующим раком молочной железы в анамнезе.

Впервые проведено фенотипическое исследование распределения субпопуляций Т-клеток памяти внутри популяций HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов, включая определение таких субпопуляций как наивные Т-лимфоциты, Т-клетки центральной памяти, Т-клетки эффекторной памяти, Т-клетки памяти со свойствами стволовых клеток и терминально-

дифференцированные Т-лимфоциты. Продemonстрировано, что полученные E75- и E88-специфичные ЦТЛ более чем на 40% представлены Т-клетками памяти со свойствами стволовых клеток, способны проявлять более выраженную цитотоксичность и отличаются более высоким уровнем продукции IFN- γ в ответ на предъявление HER2-экспрессирующих опухолевых клеток, по сравнению с показателями цитотоксичности и продукции IFN- γ смешанной культуры активированных моноклеарных клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты указывают на то, что активация Т-клеток дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы белка HER2, и последующие выделение и стимуляция CD8⁺ HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов цитокинами IL-2, IL-7 и IL-15 приводит к формированию клеток, в значительной степени представленными фенотипом Т-клеток памяти со стволовыми свойствами и способными к выраженной цитотоксичности против HER2-экспрессирующих опухолевых клеток, а также к повышению продукции IFN- γ в ответ на совместное культивирование с клетками-мишенями. Результаты исследования продукции IFN- γ свидетельствуют о том, что продукция IFN- γ имеет место при неспецифическом Т-клеточном иммунном ответе, однако уровень продукции IFN- γ существенно выше у CD8⁺ Т-клеток, реализующих антиген-специфическую цитотоксическую функцию.

Установленные данные о распределении субпопуляций Т-клеток памяти в популяциях CD8⁺ Т-клеток и в популяциях антиген-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов позволяют дополнить современное представление о содержании и соотношении циркулирующих CD8⁺ Т-клеток памяти периферической крови. Подобранная нами восьмицветная панель антител для проточной цитометрии, включающая антитела к человеческим CD8, CD45RA, CD62L, CD27, CD28, CD127, CD95 и HLA-стрептамеры, может быть использована для фенотипирования всех основных субпопуляций циркулирующих цитотоксических Т-лимфоцитов и Т-

клеток памяти как в общем лимфоцитарном пуле, так и в популяциях цитотоксических Т-лимфоцитов конкретной антигенной специфичности.

Полученные данные о различиях в содержании HER2-специфичных ЦТЛ у здоровых доноров и пациентов с HER2-позитивным раком молочной железы свидетельствуют о развитии HER2-специфичного иммунного ответа в ответ на злокачественный процесс, сопряженный с гиперэкспрессией белка HER2.

Практическая значимость исследования обусловлена разработкой протокола получения популяций HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов, в значительной степени представленных субпопуляциями Т-клеток памяти со свойствами стволовых клеток и проявляющих более выраженную цитотоксичность в отношении HER2-экспрессирующих опухолевых клеток по сравнению с активированными клетками смешанной популяции МНК ПК. Данный протокол может быть использован для разработки технологии получения противоопухолевых HER2-специфичных Т-лимфоцитов и осуществления адоптивного Т-клеточного переноса пациентам с HER2-позитивным раком молочной железы и других сопряженных с гиперэкспрессией HER2 локализаций. В частности, основанная на предложенном способе Т-клеточная иммунотерапия может быть эффективна для элиминирования HER2-экспрессирующих опухолевых клеток после удаления основной опухолевой нагрузки, для предотвращения рецидивов и метастазирования. На основании проведенного исследования получен патент №2619186 на изобретение «Способ получения *in vitro* популяций активированных антиген-специфичных противоопухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам опухоль-ассоциированного антигена».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Стимуляция культуры моноклеарных клеток периферической крови аутологичными дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы E75 и E88 белка HER2/neu, повышает содержание E75-специфичных и E88-специфичных Т-лимфоцитов и уровень их цитотоксичности против линии HER2-экспрессирующих опухолевых клеток.

2. E75- и E88-специфичные цитотоксические Т-лимфоциты, активированные аутологичными дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы E75 и E88 белка HER2, характеризуются низким содержанием наивных Т-лимфоцитов и высоким содержанием Т-клеток памяти со свойствами стволовых клеток.

Апробация материалов диссертации.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

1. Семинарах отдела экспериментальной иммунологии НИИФКИ (Новосибирск, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018).
2. Отчетных конференциях аспирантов и ординаторов НИИФКИ (2015, 2016, 2017, 2018).
3. IX отчетной научной сессии НИИФКИ (Новосибирск, 2016).
4. 52-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2014 (Новосибирск, 2014).
5. 18-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология — наука XXI века» (Пущино, 2014).
6. VIII Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 2015).
7. 15 Международном Симпозиуме по Дендритным Клеткам (15th International Symposium on Dendritic Cells) (Ахен, Германия, 2018).
8. 5 Европейском конгрессе по иммунологии (5th European Congress of Immunology — ECI) Амстердам, Нидерланды, 2018).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК. Получен 1 патент.

Самостоятельность выполненной работы:

Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором на базе лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ.

Большую признательность автор выражает научному руководителю работы профессору, д.м.н. С.В. Сенникову за подробное конструктивное обсуждение полученных результатов, а также всем сотрудникам лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ за помощь в освоении методов молекулярной и клеточной иммунологии, ценные замечания и благожелательное отношение в ходе выполнения работы. Отдельная благодарность выражается сотрудникам онкологического отделения №3 МБУЗ ГKB №1 города Новосибирска за предоставление образцов крови пациентов, а также всем донорам и пациентам, согласившимся принять участие в исследовании.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Потенциал иммунной системы в борьбе с опухолью

Функционирование иммунной системы человека напрямую связано с процессами опухолевого роста. При этом и врожденный, и приобретенный иммунный ответ могут способствовать как стимуляции, так и ингибированию опухолевого роста [Disis, 2010]. Двойственную роль иммунной системы в процессе развития рака подробно описывает концепция иммуноредактирования, сформулированная в начале XXI века, которая выделяет три основных этапа развития онкопатологии: элиминация, равновесие и ускользание [Dunn et al., 2002; Dunn et al., 2004; Schreiber et al., 2011]. На первом этапе — элиминации — спонтанно возникающие в организме опухолевые клетки уничтожаются естественными киллерными клетками (NK-клетками), $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитами [Gasser, Raulet, 2006; Aragon-Sanabria et al., 2018]. Второй этап соответствует состоянию «равновесия сил» между иммунными и опухолевыми клетками. Данное равновесие может длиться годами, до наступления третьего этапа — ускользания опухоли от иммунного надзора, который заканчивается появлением клинически диагностируемых опухолей [Dunn et al., 2004; Ribatti, 2017]. Таким образом, на момент диагностирования заболевания, в организме больного наблюдается состояние патологической иммунной толерантности, инициируемое растущей злокачественной опухолью и ее микроокружением. Сдвиг равновесия сил в сторону ускользания провоцируется опухолевыми клетками с помощью целого ряда путей, таких как утрата молекул главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) I класса, затрудняющее распознавание иммунной системой [Korkolorpoulou et al., 1996], формирование устойчивости к цитотоксическим эффектам иммунных клеток через действие белков семейства BCL-2 [Bauer et al., 2015], ингибирование Т-

лимфоцитов через рецепторы к чекпойнт-молекулам PD1, CTLA-4 и ряд других [Sotomayor et al., 1999; Iwai et al., 2005; Chikuma et al., 2009; Grywalska et al., 2018]. Показано, что на этапе ускользания происходят биомеханические изменения в микроокружении опухоли, способствующие её дальнейшему росту: повышение жесткости внеклеточного матрикса, усиление тока интерстициальной жидкости приводят к изменению нормального поведения иммунных и стромальных клеток (фибробластов и эндотелиальных клеток), окружающих клетки опухоли [Shieh, 2011; Aragon-Sanabria et al., 2018].

Понимание упомянутых механизмов взаимовлияния опухоли и иммунитета, а также накопление сведений о потенциале всех существующих звеньев иммунной системы приводит к появлению все больших успехов в области иммунотерапии рака.

За последние десятилетия в научной и клинической практике накопилось огромное количество работ, посвященных исследованию всех существующих звеньев иммунитета для предотвращения опухолевого роста [Cancer Immunotherapy, 2013; Ribatti, 2017; Aragon-Sanabria et al., 2018]. Центральными агентами клеточного звена противоопухолевого иммунного ответа являются антиген-презентирующие клетки (АПК) и Т-лимфоциты. Среди всех типов АПК дендритные клетки (ДК) рассматриваются как наиболее мощные профессиональные агенты для захвата и представления опухолевых антигенов [Banchereau, Palucka, 2005; Gelao et al., 2014]. ДК представляют собой гетерогенную популяцию лейкоцитов, выступающую в роли посредников между врожденным и приобретенным иммунитетом, способны стимулировать локальное воспаление в очагах инфекции, а также доставлять антигены в лимфоидные органы для активации Т-клеток.

Важная роль отводится $CD8^+$ цитотоксическим Т-лимфоцитам (ЦТЛ) и $CD4^+$ Т-хелперным клеткам в связи с реализацией ими непосредственного цитотоксического ответа путем продукции перфорины и гранзима В, $IFN-\gamma$, экспрессии белков семейства факторов некроза опухоли, таких как FasL, TRAIL, $TNF-\alpha$ [Peters et al., 1991; Barry, Bleakly, 2002; Sashchenko et al., 2007; Halle et al.,

2017]. Как $CD8^+$, так и $CD4^+$ Т-клетки обладают противоопухолевой активностью и ассоциированы с лучшим прогнозом выживания у больных раком [Sommermeier et al., 2016., de Wolf et al., 2018]. Однако объектом наиболее пристального внимания исследователей, занимающихся иммунотерапией опухолевых заболеваний, остаются $CD8^+$ ЦТЛ. При правильной активации они способны специфически распознавать и уничтожать малигнизированные клетки после взаимодействия с антигенными пептидами, представленными в комплексе с молекулами МНС I типа [Perica et al., 2015]. В связи с этим $CD8^+$ Т-лимфоциты наиболее часто используются для адоптивного Т-клеточного переноса [de Wolf et al., 2018]. Известно, что способность к непосредственной реализации механизмов цитотоксичности является одной из основных причин, по которым в адоптивной Т-клеточной терапии предпочтение до сих пор в большей степени отдавалось $CD8^+$ Т-клеткам, чем $CD4^+$. Однако становится всё более очевидным, что цитотоксичность не является исчерпывающим условием, и для формирования устойчивого ответа на Т-клеточную терапию не менее важна способность вводимых ЦТЛ к самоподдержанию в организме пациента. Показано, что уровень жизнеспособности и пролиферативной активности Т-клеток прямо коррелирует с противоопухолевой эффективностью адоптивной Т-клеточной терапии [Gattinoni et al., 2006; Hinrichs et al., 2006; June, 2007]. В связи с этим особенную важность приобретает наличие Т-клеток памяти в препарате для Т-клеточного переноса [Perret, Ronchese, 2008].

1.2. Роль цитотоксических Т-лимфоцитов в противоопухолевом иммунном ответе

Цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) представляют собой ключевой компонент системы адаптивного иммунного ответа, функция которой заключается

в уничтожении внутриклеточных патогенов и опухолевых клеток [de la Roche et al., 2016]

Наличие достаточного количества противоопухолевых ЦТЛ с ненарушенной функциональной активностью является необходимым условием для уничтожения опухолевых клеток иммунной системой [Aerts, Hegmans, 2013]. Иммунотерапевтические подходы, направленные на борьбу с конкретными опухоль-ассоциированными антигенами, также используют активированные антиген-специфичные цитотоксические $CD8^+$ Т-клетки в качестве главного противоопухолевого агента. Рядом работ был показан цитотоксический эффект антиген-специфичных ЦТЛ в отношении клеток различных типов опухолей. Так, например, еще в 2000 году было продемонстрировано, что цитотоксические Т-лимфоциты, специфичные к HLA-A2-рестриктированному пептиду PR1, способны уничтожать лейкозные клетки и могут способствовать ликвидации хронического миелолейкоза [Molldrem, 2000]. В 2008 году клиническое исследование показало способность ЦТЛ, специфичных к пептиду HER2₃₆₉₋₃₇₇ опухолевого антигена HER2/neu, элиминировать клетки опухоли молочной железы в организме пациенток с помощью адоптивного переноса популяций HER2-специфичных Т-лимфоцитов [Bernhard et al., 2008].

В научной литературе описано несколько основных механизмов реализации цитотоксической функции $CD8^+$ Т-лимфоцитов, к которым относятся продукция молекул перфорины и гранзима В, IFN- γ , запуск апоптоза через поверхностные молекулы FASL, TRAIL, и другие [Liu et al., 2006]. Механизм клеточной гибели, основанный на цитотоксическом эффекте гранул гранзима и перфорины традиционно рассматривается как основной механизм, который используют ЦТЛ и НК-клетки для элиминации клеток-мишеней, в том числе опухолевых [Rousalova, Krepela, 2010]. Литические гранулы — это мембрано-связанные секреторные лизосомы, имеющие плотный центр, состоящие из различных белков. [Peters et al., 1991]. Основным содержимым литических гранул, которое обеспечивает защиту организма от инфицированных или трансформированных клеток, являются проапоптотические сериновые протеазы — перфорин и гранзим В. Дегрануляция

CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов происходит незамедлительно после активации Т-клеточного рецептора (ТКР), и является необходимым шагом грануло-опосредованного лизиса клеток, требующимся для немедленной литической функции [Barry, Bleackley, 2002].

Fas–рецептор, запускающий один из основных механизмов цитотоксической активности ЦТЛ, является рецептором «смерти», относится к семейству TNF рецепторов и экспрессируется на различных тканях, в том числе на эпителиальных клетках кишечника, молочной железы. Fas-опосредованный механизм апоптоза участвует в элиминации трансформированных клеток, снижая риск развития опухолевого процесса. Опухоль-специфичные активированные ЦТЛ используют Fas-лиганд на своей поверхности и соединяются с Fas рецептором на поверхности опухолевой клетки, запуская внутриклеточный каскад каспаз, приводящий к ее гибели [Poehlein et al., 2003; Cullen et al., 2010].

Несмотря на факт того, что грануло-опосредованный механизм цитотоксичности является доминантным при функционировании ЦТЛ, результаты последних исследований доказывают важность других механизмов запуска апоптоза при опухоль-специфической цитотоксичности CD8⁺ Т-лимфоцитов. Например, было показано, что грануло-опосредованный цитолиз лучше действует при минимальной опухолевой нагрузке и становится менее эффективным при ее увеличении. Тогда большее значение приобретает Fas-опосредованный механизм апоптоза [Poehlein et al., 2003].

1.3. Дифференцировка и созревание цитотоксических Т-лимфоцитов

Известно, что после прохождения антиген-независимой дифференцировки, включающей позитивную и негативную селекцию, Т-клетки покидают тимус как зрелые, наивные Т-лимфоциты (Т naïve, Т_N), несущие заданную специфичность к определенным антигенным детерминантам.

Когда циркулирующие наивные $CD8^+$ Т-лимфоциты сталкиваются с антигеном нужной специфичности, представленным в комплексе с молекулами МНС I класса на поверхности АПК в периферических лимфоидных органах, запускается процесс антиген-зависимой Т-клеточной дифференцировки [de la Roche et al., 2016]. Сразу после встречи с соответствующими АПК наивные Т-клетки замедляются и останавливаются — этот шаг контролируется сигналингом интегринов [Dustin, Springer, 1989]. Активация ТКР запускает формирование высокоспецифичного клеточного контакта, известного как иммунологический синапс. Этот первичный синапс запускает быструю клональную экспансию и эффекторную дифференцировку, и в течение следующих 4-5 дней наивные $CD8^+$ Т-клетки дифференцируются в хорошо «вооруженные» эффекторные клетки, нагруженные специализированными цитолитическими гранулами, которые содержат молекулы перфорины и гранзимов. Одновременно с этим наивные Т-лимфоциты увеличиваются в размере (до 10 мкм, приблизительно), у них развивается гораздо более сложный цитоскелетный аппарат, который требуется для доставки цитолитических гранул к иммунологическому синапсу. Как только ЦТЛ распознает клетки-мишени соответствующей специфичности на периферии, между ним и мишенью также образуется синапс, названный цитолитическим: через него осуществляется секреция цитолитических гранул [de la Roche et al., 2016].

Структурно иммунологический и цитолитический синапсы очень похожи: в обоих случаях Т-клетки формируют центральный супрамолекулярный активационный кластер Т-клеточного рецептора (central Supramolecular activation cluster, cSMAC) [Potter et al., 2001; O’Keefe et al., 2004], поляризуют свои centrosомы (единственный тип центра организации микротрубочек в Т-клетках) в направлении места контакта с АПК [Stinchcombe et al., 2006] и реорганизуют свой цитоскелет для формирования дистального супрамолекулярного активационного кластера (distal Supramolecular activation cluster, dSMAC). Однако цели у этих синапсов разные: наивные Т-клетки праймируются для дальнейшей пролиферации и дифференцировки в ЦТЛ в течение нескольких дней, тогда как ЦТЛ при встрече

с антигеном реализуют быструю, поляризованную секрецию цитолитических гранул к точке сигналинга ТКР в течение нескольких минут [de la Roche et al., 2016].

В настоящее время в литературе рассматриваются несколько основных моделей, описывающих созревание наивных Т-лимфоцитов. Одна из моделей описывает «линейную дифференцировку» эффекторных клеток и клеток памяти от единого «наивного» предшественника [Ahmed et al., 2009]. Согласно данной модели, после активации наивных Т-лимфоцитов происходит формирование как короткоживущих эффекторных клеток, так и клеток, способных впоследствии формировать долгоживущие клетки памяти.

Также существует «ассиметричная» или «бифуркационная» модель дифференцировки Т-лимфоцитов [Кудрявцев, 2014], согласно которой различные типы эффекторных клеток и клеток памяти начинают формироваться уже после первого митотического деления исходного Т-лимфоцита после его активации. Та дочерняя клетка, что расположена ближе к АПК, формирует клон эффекторных клеток, тогда как другая дочерняя клетка, оказавшаяся в результате цитокинеза дальше от исходной АПК, будет формировать клетки памяти. Предпосылкой к такому разделению служит утверждение, что в состав первой дочерней клетки будет входить исходный иммунологический синапс, формирующий более сильный сигнал от ТКР, в связи с чем данный дочерний лимфоцит будет подвержен действию высоких концентраций цитокинов, выделяемых АПК (в первую очередь таких, как IL-12 и IFN- γ). По мере удаления от АПК влияние цитокинов будет снижаться, что может служить поводом для формирования клеток не эффекторного типа.

Идеологически близкая теоретическая модель описана исследователями как «signal-strength model» [Lanzavecchia et al., 2002]. Дифференцировка Т-клеток зависит в данной теории от силы активационного сигнала, получаемого наивным Т-лимфоцитом в момент ее активации в лимфоидной ткани. Если суммарная сила сигналов от ТКР, ко-стимуляторных молекул и стимуляторных цитокинов превышает некое среднее значение, то в результате образуются «терминально-дифференцированные» эффекторные клетки. Если же суммарная сила

стимуляторных сигналов снижена, то из активируемой Т-клетки развиваются Т-клетки сначала эффекторной, а затем центральной памяти, соответственно. В соответствии с данной гипотезой, наивная Т-клетка может дать начало любой популяции более зрелых клеток.

Еще одна теоретическая модель носит название «*separate-precursor model*», согласно которой Т-лимфоцит, выходящий из тимуса, заранее имеет предопределенную «судьбу» и может дифференцироваться только в один конкретный тип клетки [Gerlach et al., 2010].

Следует отметить, что большая часть упомянутых выше моделей дифференцировки описана и изучена на примере цитотоксических Т-клеток, а не Т-хелперов. Кроме того, существенная часть экспериментов была проведена на мышиных моделях и лишь незначительная — на человекообразных обезьянах. На человека данные модели обычно переносятся на основании исследований в условиях *in vitro* или клинических наблюдений.

Несмотря на многообразие возможных вариантов, большинство исследователей сходятся во мнении, что дифференцировка антиген-специфичных Т-клеток в периферических лимфоидных органах носит последовательный линейный характер — T_N , T_{SCM} , клетки T_{CM} , клетки T_{EM} и T_{EMRA} [Lugli et al., 2013, Mahnke et al., 2013; Кудрявцев, 2014].

1.3.1. Наивные Т-лимфоциты

Предшественниками ЦТЛ являются наивные Т-клетки, которые становятся ЦТЛ в результате процесса, называемого дифференцировкой Т-клеток. Наивные Т-лимфоциты представляют собой маленькие (около 5 мкм в диаметре), относительно неподвижные клетки округлой формы, циркулирующие между лимфатической системой и кровью в поиске антигена соответствующей специфичности [de la Roche et al., 2016].

Отличительной особенностью популяции наивных Т-клеток является наличие на клеточной мембране таких поверхностных маркеров как CD45RA, CD62L и CCR7. CD62L или L-селектин, отвечает за миграцию клеток через эндотелий периферических лимфоидных органов, а молекула CCR7 (или CD197), представляет собой рецептор, отвечающий за миграцию клеток в Т-зависимые зоны лимфоидных органов. Присутствие на поверхности клеток пары CD62L и CCR7 позволяет T_N клеткам эффективно проникать в очаги воспаления и вторичные лимфоидные органы. На поверхности наивных Т-клеток полностью отсутствуют рецепторы для хемокинов, отвечающих за миграцию в очаг воспаления.

Помимо экспрессии маркеров CD62L и CCR7 важным отличием T_N клеток от большинства Т-клеток более высокого уровня дифференцировки является высокая экспрессия ко-стимулирующих молекул CD27 и CD28. CD27 является рецептором семейства TNFR, необходимым для генерации и длительного поддержания Т-клеточного иммунитета; его лиганд на антиген-презентирующих клетках — молекула CD70). Лигандами мембранного рецептора CD28 являются молекулы CD80 и CD86 на АПК, взаимодействие с ними необходимо для активации Т-клетки.

Показано также, что наивные Т-клетки способны к продукции IL-2, но не к продукции эффекторных цитокинов, таких как IL-4, IL-5 и IFN- γ [Geginat et al., 2003]. При исследовании пролиферативной активности Т-лимфоцитов показано, что наивные CD8⁺ Т-клетки не отвечают на стимуляцию IL-7 и IL-15 в условиях *in vitro*, тогда как клетки центральной и эффекторной памяти активно пролиферируют в ответ на добавление данных цитокинов в культуральную среду.

1.3.2. Субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови

Учитывая выраженную гетерогенность клеток Т-лимфоцитарного пула, пока не удалось достичь консенсуса в фенотипическом определении и классификации наивных Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти.

Основным фенотипическим признаком Т-клеток памяти принято считать появление изоформы CD45RO⁺ взамен изоформы CD45RA⁺.

Молекулы CD62L и CCR7, опосредующие хоминг клеток в лимфоидные органы, стали использоваться в комбинации с маркерами CD45RA/CD45RO для фенотипического определения субпопуляций CD8⁺ Т-клеток памяти с конкретными эффекторными функциями.

Показано, что CD45RA-негативные/CD45RO-позитивные Т-клетки памяти, экспрессирующие CCR7, продуцируют большое количество IL-2, но низкий уровень эффекторных цитокинов, таких как IL-4, IL-5 и IFN- γ , тогда как CCR7-негативные Т-клетки памяти продуцируют высокий уровень IL-4 и IL-5 (в случае Т-хелперов), а также IFN- γ (в случае Т-киллеров), и содержат гранулы перфорины и гранзима. CCR7⁺ Т-клетки памяти были названы клетками центральной памяти (T central memory, T_{CM}) из-за их способности к миграции во вторичные лимфоидные органы. А CCR7⁻ Т-клетки памяти были названы Т-клетками эффекторной памяти (T effector memory, T_{EM}) из-за высокой скорости реализации эффекторных функций и миграции в органы и ткани нелимфоидной природы. Установлено, что Т-клетки центральной памяти способны дифференцироваться в Т-клетки эффекторной памяти, тогда как клетки эффекторной памяти не обладают способностью дифференцироваться в клетки центральной памяти [Samji, Khanna, 2017].

Для Т-клеток центральной памяти, как хелперной, так и киллерной популяций, характерно наличие на поверхностной мембране следующих антигенов: CD45RO, CCR7, CD62L, CD27, CD28 и ряда других [Mahnke et al., 2013].

Известно, что длина теломер клеток T_{CM} несколько меньше, чем у наивных Т-клеток, но превосходит таковую клеток T_{EM} . Поэтому, по мнению многих исследователей, клетки центральной памяти можно рассматривать в качестве самой долгоживущей популяции Т-клеток. Также считается, что Т-клетки центральной памяти обладают самыми длительными сроками циркуляции в организме по сравнению с другими популяциями клеток памяти [Macallan et al., 2004].

Ключевую роль в запуске пролиферации T_{CM} *in vitro*, помимо сигнала от ТКР и дополнительного сигнала от костимулирующих молекул, играет наличие IL-7 и IL-15. Часть клеток в присутствии этих цитокинов способна терять CCR7 и приобретать набор рецепторов к провоспалительным хемокинам [Geginat et al., 2003]; при этом в составе клеток центральной памяти увеличивается доля клеток, способных к продукции эффекторных цитокинов — IL-4 и IFN- γ . Цитотоксические Т-клетки центральной памяти в присутствии этих цитокинов формировали популяции, обладающие признаками Т-клеток эффекторной памяти, что проявлялось в снижении уровня CD62L и CCR7 [Alves et al., 2003]. Кроме того, часть клеток вновь начинала экспрессировать CD45RA, что свойственно уже для популяции терминально-дифференцированных эффекторных Т-лимфоцитов.

В связи с тем, что большая часть клеток T_{EM} представлена зрелыми эффекторными клетками, у них снижены пролиферативная активность и способность к самообновлению, тогда как способности к синтезу и секреции цитокинов, экспрессии эффекторных молекул значительно превышают таковые у Т-клеток центральной памяти.

1.3.3. Дополнительные субпопуляции Т-клеток памяти

Помимо двух основных субпопуляций Т-клеток памяти, в периферической крови здоровых доноров также обнаруживаются несколько дополнительных

популяций, отличающихся по фенотипу и функциональным характеристикам. К таковым относится т.н. популяция Т-лимфоцитов, обладающих некоторыми свойствами стволовых клеток (T stem cell memory, T_{SCM}). Принципиальным отличием популяции T_{SCM} от наивных Т-клеток является высокий уровень экспрессии маркеров CD95 и CD122, тогда как общим для указанных популяций является наличие поверхностных маркеров CD45RA, CCR7, CD62L, CD27, CD28 и CD127 при полном отсутствии CD45RO [Gattinoni et al., 2011; Flynn, Gorry, 2014]. При изучении функциональной активности данных клеток в условиях *in vitro* было показано, что CD4⁺ и CD8⁺ T_{SCM} клетки способны к синтезу и секреции как IL-2, так и эффекторных цитокинов — IFN-γ и TNF-α [Gattinoni et al., 2011; Flynn, Gorry, 2014]. Исследования пролиферативной активности выявило существенные отличия данных клеток от наивных Т-лимфоцитов — T_{SCM} подобно клеткам памяти способны были отвечать на внесение IL-15. В отличие от Т-клеток центральной памяти большая часть (до 60%) T_{SCM}, образовавшихся в результате нескольких раундов делений, сохраняет набор собственных поверхностных маркеров CCR7⁺, CD62L⁺, CD45RA⁺, что указывает на способность к самообновлению.

Показано, что T_{SCM}, способны дифференцироваться в клетки центральной и эффекторной памяти в ответ на *in vitro* стимуляцию анти-CD3/CD2/CD28 антителами, тогда как в аналогичных условиях клетки центральной и эффекторной памяти не формируют Т-лимфоциты со свойствами стволовых клеток [Cieri et al., 2013]. В литературе наиболее распространено предположение о том, что данная популяция представляет собой пул слабо дифференцированных Т-клеток памяти, способных к длительному самоподдержанию и циркуляции в периферических лимфоидных органах [Lugli et al., 2013; Flynn, Gorry, 2014].

Еще одна субпопуляция, выделяемая исследователями, получила название «transitional» memory T-cells (T_{TM}) или «переходные» Т-клетки памяти [Fritsch et al., 2005; Okada et al., 2008]. Клетки этой субпопуляции имеют фенотип CCR7⁻/CD62L⁻, CD28⁺. Название субпопуляции указывает на то, что данные клетки считаются более дифференцированными, чем T_{SCM} клетки, но при этом они не достигли уровня дифференцировки клеток эффекторной памяти по фенотипическим признакам

[Fritsch et al., 2005; Okada et al., 2008] и величине пролиферации в ответ на действие IL-15 *in vivo* [Picker et al., 2006, Lugli et al., 2010].

Эффекторные или «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные (T_{EMRA}) Т-клетки рассматриваются в качестве финальной стадии созревания Т-лимфоцитов, которую можно обнаружить в периферической крови. Данная популяция представляет собой клетки, негативные по экспрессии CCR7, CD62L, CD27 и CD28, которые повторно экспрессируют маркер CD45RA (откуда и происходит обозначение T-Effector Memory RA). Отсутствие на большинстве клеток ко-стимулирующих молекул CD27 и CD28 может свидетельствовать о том, что активация эффекторных клеток может происходить под действием «не-профессиональных» АПК (в случае Т-хелперов) или непосредственно клетками-мишенями (в случае ЦТЛ) [Sallusto et al., 2004]. Показано, что терминально-дифференцированные эффекторные клетки памяти встречаются чаще среди CD8-позитивных Т-лимфоцитов, чем среди Т-хелперов [Mahnke et al., 2013]. T_{EMRA}-клетки экспрессируют маркеры старения и проявляют сниженную способность к пролиферации и уровень функциональной активности [Brenchley et al., 2003, Geginat et al., 2003], что также можно считать показателем их терминальной дифференцировки.

Особняком среди популяций Т-клеток памяти стоят так называемые резидентные тканевые Т-клетки памяти. Данная популяция представляет собой не циркулирующие CD45RO-позитивные Т-лимфоциты, основными маркерами которых, вне зависимости от тканевой локализации, являются молекулы CD69 и CD103. Тканевые Т-клетки памяти играют ключевую роль в защите слизистых поверхностей и эпителия от патогенных микроорганизмов. Имеющиеся данные об экспрессии молекул CD62L и CCR7 на поверхности нециркулирующих тканевых Т-клеток памяти позволяют сделать вывод, что данная популяция представлена большей частью клетками с фенотипом Т-лимфоцитов эффекторной памяти, и лишь на 5-10% от общего числа — клетками центральной памяти.

1.4. Методы исследования популяций Т-клеток памяти

Иммунофенотип Т-клеток памяти и субпопуляции Т-лимфоцитов определяются методом многоцветной проточной цитометрии [Хайдуков и др., 2009; Кудрявцев, 2014]. На сегодняшний день стало возможным выявление всех основных субпопуляций циркулирующих Т-клеток памяти по одновременной экспрессии ряда поверхностных маркеров [Mahnke et al., 2013; Кудрявцев, 2014].

Ещё одним методом исследования Т-клеток памяти является измерение относительной длины теломер методом проточной цитометрии. Длина теломер отличается у клеток, прошедших разное количество клеточных делений. Таким образом, по данному параметру можно отличать наивные Т-лимфоциты от Т-клеток памяти, а также судить о количестве делений, совершенных исследуемыми Т-лимфоцитами.

Для оценки функциональной активности Т-клеток памяти используются следующие методы. Наиболее оптимальным способом исследования антиген-индуцированной пролиферации Т-лимфоцитов является метод прижизненного окрашивания ядра клетки флуоресцентным красителем, к примеру, CFSE.

Следующим важным аспектом активности Т-клеток памяти является способность к продукции цитокинов в ответ на антигенную стимуляцию. Методы оценки цитокинов достаточно разнообразны. Наиболее распространенными являются методы иммуноферментного анализа, такие как ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) и ELISPOT (enzyme-linked ImmunoSpot) [Lalvani, Pareek, 2010; Calarota, Bandanti, 2013].

Для анализа эффекторных функций ЦТЛ раньше широко использовали тест по высвобождению радиоактивного хрома. Этот метод имеет ряд неудобств и ограничений для использования в клинической практике, связанных с утилизацией радиоактивных отходов, короткого времени полураспада изотопов и сложностями в стандартизации [Абакушина, 2015]. Позднее появился более удобный метод, использующий для оценки Т-клеток-эффекторов гранзим В. Наиболее удобно и

информативно использовать метод ELISPOT для оценки количества клеток, выделяющих гранулы гранзима В в ответ на стимуляцию антигеном.

Другим способом анализа специфической дегрануляции $CD8^+$ Т-клеток памяти является метод определения маркера CD107a (LAMP-1). Этот антиген входит в состав мембраны цитолитических гранул и отсутствует на поверхности не активированных Т-лимфоцитов. При дегрануляции клеток-эффекторов мембраны гранул сливаются с цитоплазматической мембраной, в результате чего данная молекула появляется на поверхности клетки, позволяя выявить эффекторные Т-клетки методом проточной цитометрии [Mittendorf et al., 2005].

Использование мультимеров позволяет напрямую выявлять антиген-специфичные Т-лимфоциты и выделять искомые клетки из смешанных клеточных популяций. Ограничением данного метода является МНС-рестрикция тетрамеров, то есть, молекула МНС мультимера должна совпадать с МНС-гаплотипом исследуемых клеток.

1.4.1. Идентификация антиген-специфичных Т-клеток с помощью МНС-мультимеров

Для выделения популяций антиген-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов был разработан ряд методик, использующих молекулы МНС I класса. Принцип методик, связанных с МНС, основан на использовании лиганда ТКР, который представляет собой комплекс МНС/пептид, в качестве окрашивающего зонда. МНС взаимодействует с ТКР, который экспрессирован на поверхности Т-клеток. Поскольку взаимодействия ТКР-МНС имеют очень слабое сродство друг к другу, мономерные комплексы МНС/эпитоп не могут обеспечить стабильное связывание. Эта проблема была разрешена с использованием мультимеризованных комплексов МНС-эпитопов, что увеличивает авидность реакции связывания и, следовательно, способствует образованию стабильного комплекса. [Knabel et al.,

2002]. Флуорохромы, конъюгированные к МНС мультимерами, могут быть использованы для идентификации антиген-специфичных Т-клеток с помощью проточной цитометрии. Рекомбинантные молекулы МНС конъюгируются с антигенными пептидами, специфичными для определенных заболеваний.

Известно несколько разновидностей МНС-мультимеров для окрашивания человеческих, мышинных и крысиных Т-клеток, к которым относятся димеры, тетрамеры, и октамеры [Svensson et al., 2005; Binder, Srivastava, 2005; Duplan et al. 2007; Choi, Eo, 2013]. Все перечисленные типы мультимеров позволяют проводить визуализацию и выделение популяций антиген-специфичных клеток. Однако, использование технологии мультимеров в клинической практике для получения CD8⁺ Т-лимфоцитов, пригодных к введению пациенту, невозможно, поскольку недопустимо введение в организм пациента молекул стрептавидина и его производных, используемых для создания мультимеров, а также поскольку показана высокая степень апоптоза выделенных по технологии мультимеров Т-клеток, который в конечном счете происходит из-за длительной активации ТКР HLA мультимерами [Bouquié et al., 2009].

В 2007 году немецкими исследователями была разработана технология «стрептамеров», позволяющая производить обратимое флуоресцентное окрашивание антиген-специфичных Т-клеток. [Neudorfer et al., 2007; Schmitt et al., 2011]. Технология стрептамеров позволяет осуществлять идентификацию и выделение фракции антиген-специфичных Т-клеток при температуре 4°C. Поэтому, а также поскольку реагенты окрашивания удаляются с мембран клеток, отсутствует влияние на функциональное состояние клеток. В технологии используются синтетические молекулы Strep Tactin, образующие комплекс с молекулярными конструкциями Strep-Tag, несущими молекулы МНС I класса и антигенный пептид необходимой специфичности. После кратковременной совместной инкубации реагенты Strep Tactin и МНС-Strep-tag образуют комплекс, специфически связывающийся с CD8⁺ Т-клетками, специфичными к антигенному пептиду, представленному в комплексе МНС на стрептамерах. Молекулы флуорохрома, входящие в состав стрептамеров, позволяют визуализировать

клетки, связавшиеся с окрашивающим комплексом. При этом по завершении процедуры окрашивания и/или выделения антиген-специфичных клеток добавление d-биотина, конкурирующего с молекулами Strep-tag за сайты связывания на Strep Tactin, приводит к быстрому распаду МНС-стрептамеров. Сначала от окрашивающего комплекса отделяется молекула Strep Tactin, поскольку константа связывания биотина со Strep Tactin превышает таковую для связи Strep Tactin-Strep-tag, после чего происходит спонтанная диссоциация молекул МНС-пептид с поверхности клеток из-за недостаточной аффинности мономерных молекул МНС. Таким образом, метод окрашивания стрептамерами включает в себя преимущества обычных методов необратимого окрашивания МНС мультимерами, но при этом также позволяет осуществлять удаление окрашивающих реагентов до того, как появляется вероятность развития негативных эффектов от связывания лиганда с поверхностными рецепторами Т-клеток. Принцип обратимого окрашивания антиген-специфичных $CD8^+$ Т-клеток стрептамерами показан на рисунке 1.1.

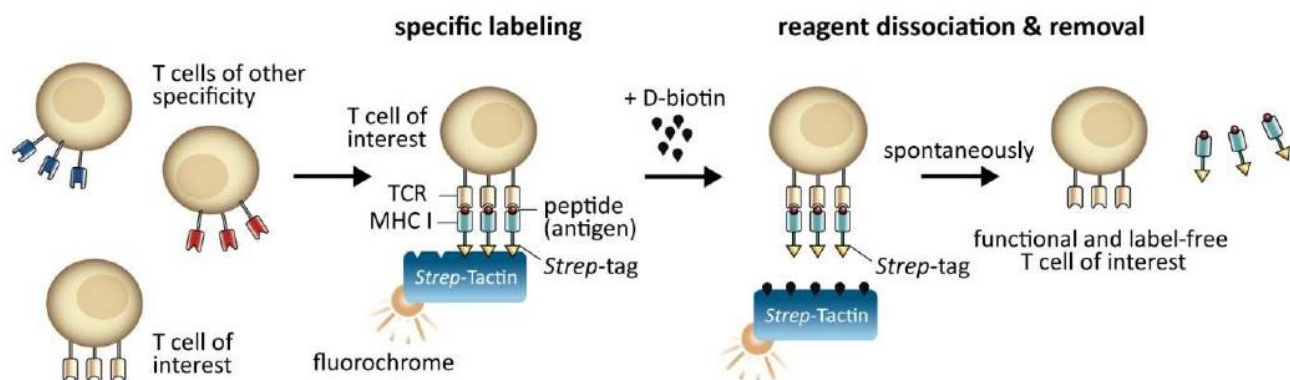


Рисунок 1.1 — Схема окрашивания Т-клетки интересующей специфичности комплексом Streptamer (Strep Tactin, конъюгированный с флуорохромом и молекулами Strep-tag, несущими МНС I класса с заданным антигенным пептидом) и последующего биотин-индуцированного удаления окрашивающего комплекса с поверхности окрашенной клетки (МНС I Streptamer Manual, 2013).

В научной литературе представлены случаи использования технологии стрептамеров для клинических исследований [Germeroth, 2009; Schmitt et al., 2011].

В 2008 году группой немецких исследователей из Мюнхена было опубликовано сообщение, в котором впервые сообщается об осуществленном адоптивном переносе аутологичных HER2 специфичных Т-клеток в организм пациентки с HER2 гиперэкспрессирующим раком молочной железы [Bernhard et al., 2008]. Для изоляции целевых антиген-специфичных клеток из смешанной популяции клеток периферической крови была использована технология обратимого окрашивания HLA мультимерами, также разработанная учеными Мюнхенского Технического Университета, в 2002 году [Knabel et al., 2002]. Данная технология обратимого окрашивания уступает технологии стрептамеров, описанной в 2007 г [Neudorfer et al., 2007], по чистоте и качеству получаемых популяций клеток, что было отмечено авторами технологий. Тем не менее, клетки, изолированные с помощью технологии обратимого окрашивания МНС мультимерами, были допущены к адоптивному переносу.

В работе Bernhard и соавторов было показано, что антиген-специфичные цитотоксические Т-клетки, полученные с помощью стимуляции антиген-нагруженными дендритными клетками, и изолированные с помощью обратимого окрашивания HLA мультимерами при введении пациенту сохранили свою функциональную активность и проявили цитотоксичность в отношении опухолевых клеток в организме пациента [Bernhard et al., 2008].

Компания-производитель технологии стрептамеров, STAGE pharmaceuticals, в 2009 году стала спонсором этапа I/II клинического исследования, под названием “Adoptive immune therapy of chemotherapy-refractory CMV-infection with Streptamer®-selected T-cells after allogeneic bone marrow- or peripheral blood stem cell transplantation” (Eudra CT 2006-006146-34) [DRKS, German Clinical Trials Register]. Предложенный компанией протокол клеточной терапии направлен на лечение цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции после трансплантации стволовых клеток путем переноса ЦМВ-специфичных CD8⁺ Т-лимфоцитов от донора инфицированному пациенту.

В 2011 году немецкими исследователями были опубликованы первые результаты данного исследования [Schmitt et al., 2011]. Авторы сообщают о

проведении адоптивного переноса ЦМВ-специфичных Т-клеток двум пациентам с острой лимфобластной лейкемией, и острой миелоидной лейкемией соответственно, с рецидивирующей высокой ЦМВ антигенемией у обоих пациентов, возникшей после аллогенной трансплантации стволовых клеток. Адоптивный перенос в обоих случаях был проведен успешно, без побочных эффектов и без развития реакции трансплантат-против-хозяина, и привел к полной продолжительной ремиссии заболевания. Инфузия ЦМВ-специфичных клеток привела к быстрому устранению цитомегаловирусной антигенемии у обоих пациентов, что позволило вскоре после совершения переноса отменить прием антивирусных препаратов.

Данная работа показала, что технология стрептамеров позволяет осуществлять изоляцию CD8⁺ ЦМВ-специфичных Т-клеток, которые затем возможно переносить от донора пациенту. Выделенные и перенесенные таким образом клетки проявляют полную функциональность *in vivo*, не содержат значимых количеств изолирующих реагентов и доступны для Т-клеточного переноса в течение 24 часов после афереза.

1.5. Дендритные клетки

1.5.1. Иммунобиология дендритных клеток

Предшественники ДК находятся в костном мозге, а также обнаруживаются в периферической крови. Незрелые ДК локализуются в периферических органах и на слизистых оболочках, где они постоянно контролируют наличие чужеродных антигенов. Морфологически, незрелые ДК характеризуются развитым цитоскелетом, низкой подвижностью и небольшим количеством отростков. В незрелом состоянии способность ДК стимулировать Т-клетки ограничена,

поскольку данные клетки экспрессируют низкий уровень ко-стимулирующих молекул. При этом они обладают выраженной способностью поглощать и обрабатывать различные антигены [Rosenblatt, 2003]. ДК используют фагоцитоз, пиноцитоз, эндоцитоз, а также рецептор–опосредованный захват антигенов для иммунной презентации [Rossi, Young, 2005]. Фагоцитирующая способность ДК отличается от способности макрофагов. ДК более селективно поглощают небольшие количества антигенов, которые в последующем представляются в комплексе с молекулами МНС на поверхности ДК. Незрелые ДК экспрессируют на своей поверхности Fc-рецепторы, рецепторы комплемента и маннозные рецепторы после взаимодействия с экзогенными белками. В отличие от макрофагов ДК экспрессируют $\alpha\beta 5$ интегрин, играющий роль в презентировании пептидных фрагментов апоптотических клеток в комплексе с МНС I класса. Рецепторы к гранулоцитарно-макрофагальному колониестимулирующему фактору (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) на поверхности незрелых ДК поддерживают дифференцировку, жизнеспособность и длительное выживание ДК.

Одновременно с захватом, обработкой и презентированием антигенов ДК подвергаются процессу созревания. Созревание ДК, фенотипически характеризующееся повышенной экспрессией мембрано-связанных костимуляторных молекул, таких как CD80, CD86 и МНС II класса [Zehn et al., 2004; Turnis, Rooney, 2010], — это сложный процесс, который развивается в ответ на влияние провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, TNF- α , и IL-6, и специфических молекул, включающих в себя патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) от инфекционных патогенов и молекулярные фрагменты, связанные с повреждением (damage-associated molecular patterns, DAMP) от поврежденных собственных тканей, которые связываются с толл-подобными рецепторами (toll-like receptors, TLR) на поверхности ДК или с эндосомами [Sabatté et al., 2007; Vliet et al., 2007]. Дифференцированная активация TLR определяет тип секретирующихся цитокинов, который в свою очередь определяет класс Т-клеток, ответ которых

будет запущен. [Akira et.al., 2006]. К примеру, зрелые ДК продуцируют такие цитокины, как IL-12, IL-18 и IFN α , которые поляризуют дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в сторону Т-хелперов 1-го типа, которые, в свою очередь, продуцируя IFN- γ , способствуют дифференцировке и пролиферации CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов [Jong de et al., 2005; Dunn et al., 2006; Turnis, Rooney, 2010]. Зрелые дендритные клетки мигрируют в лимфоидные органы, где они активируют Т-лимфоциты посредством взаимодействия рецептора CD40, расположенного на поверхности дендритных клеток, с CD40-лигандом, экспрессирующимся на поверхности Т-клеток, запуская таким образом антиген-специфический ответ против представленных антигенов [Nencioni et al., 2008].

Морфологически, зрелые ДК отличаются многочисленными выростами, которые облегчают подвижность и увеличивают площадь для контакта с Т-клетками, низкой плотностью цитоплазмы, отсутствием адгезивных свойств, недостаточной экспрессией линейно специфичных поверхностных маркеров для Т-, В-, NK-клеток и макрофагов. Изменения морфологии в процессе созревания дендритных клеток обеспечивает актин-связывающий белок p55 фасцин. Функциональные изменения зрелых ДК состоят в потере способности к фагоцитозу, обработке и представлению антигенов, при этом зрелые дендритные клетки приобретают способность более эффективно, чем макрофаги и В-клетки стимулировать дифференцировку и пролиферацию Т-клеток [Kadowaki et al., 2001; Jong de et al., 2005].

В научной литературе выделяют два основных типа дендритных клеток — миелоидные и плазмоцитоидные ДК. [Dzionek et al., 2000; Gelao et al., 2014]. Миелоидные дендритные клетки (мДК) образуются из миелоидных предшественников, экспрессируют на своей поверхности маркеры CD11c, не экспрессируют популяционные маркеры других клеток иммунной системы, таких как CD14 (моноциты, макрофаги и нейтрофилы), CD3 (Т-лимфоциты) и не имеют также маркера CD123, характерного для плазмоцитоидных ДК. мДК нуждаются в GM-CSF для роста и развития, способны к захвату антигена и активации Т-клеток, секретируют IL-12 и IL-18. Также как и ДК, полученные *in vitro* из моноцитов

периферической крови, миелоидные дендритные клетки рассматриваются в основном как АПК, участвующие в инициации и регуляции антиген-специфического иммунного ответа, и широко используются в клинических исследованиях, основанных на дендритных клетках.

Плазмоцитоидные ДК (пДК) — это клетки лимфоидного происхождения, морфологически подобные плазмоцитоидным клеткам. Данному типу клеток необходим ИЛ-3 для дифференцировки из предшественников, циркулирующих в периферической крови, которые характеризуются низкой экспрессией рецепторов к GM-CSF, отсутствием миелоидных маркеров CD14, CD11c и маннозных рецепторов, а также экспрессией CD123 [McKenna et al., 2005]. пДК известны как продуценты интерферона, секретирующие большое количество IFN I типа в ответ на вирусные инфекции и тем самым блокирующие распространение вируса [Nencioni et al., 2008]. Пригодность плазмоцитоидных дендритных клеток в клинических подходах для вакцинации не определена однозначно, однако доклинические исследования показали, что пДК могут действовать совместно с мДК для индукции антиген-специфического противоопухолевого иммунного ответа [Lou Y et al., 2007].

1.5.2. Получение дендритных клеток *in vitro*

Множеством исследований показано, что в организме онкологических больных дендритные клетки обнаруживают отклонения в функциях и задержку в созревании, что затрудняет активацию Т-лимфоцитов из-за сниженного захвата и процессинга антигенов, низкого уровня экспрессии костимуляторных сигналов, их слабой подвижности и ряда других нарушений [Chan, Housseau, 2008; Gelao et al., 2014].

Основанная на ДК иммунотерапия используется во всем мире с целью индуцировать или усилить противоопухолевый иммунный ответ у пациентов с

онкологическими заболеваниями. При этом активно исследуется возможность индукции специфических противоопухолевых иммунных реакций как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* [Jeras et al., 2005; Boudreau et al., 2011; Курилин и др., 2013].

Примером использования *in vivo* стимуляции иммунного ответа являются основанные на ДК клеточные вакцины. В большом количестве клинических исследований дендритные клетки, нагруженные опухолевыми антигенами, используются в качестве клеточной вакцины, вводимой пациентам [Wieresky et al., 2006; Tendeloo et al., 2010; Rosenblatt et al., 2013]. Авторами установлена безопасность подобных вакцин, показана целесообразность *in vivo* стимуляции иммунной системы с помощью ДК, зарегистрирован клинический эффект ДК-вакцины [Smith et al., 2002; Sandel et al., 2005; Wurzenberger, 2008; Jursik et al., 2009; Tendeloo et al., 2010; Rosenblatt et al., 2013].

Однако, известно, что эффективность вакцин, основанных на введении дендритных клеток, может быть снижена в связи с нарушением механизма представления антигена под влиянием опосредованных опухолью ингибирующих факторов. Множеством исследований показано, что *in vivo* дендритные клетки в присутствии опухоли обнаруживают отклонения в функциях, которые затрудняют активацию Т-лимфоцитов из-за сниженного захвата и процессинга антигенов, низкого уровня экспрессии костимуляторных сигналов, их слабой подвижности и ряда других нарушений [Gelao et al., 2014]. Такая ситуация особенно имеет место в случаях с III и IV стадиями заболевания. В ряде исследований полученные многообещающие результаты в стимуляции иммунного ответа ДК-вакцинами в случаях I и II фазы заболевания не удалось повторить для пациентов с III стадией рака [Schadendorf et al., 2006; Higano et al., 2009].

Группой исследователей из Нидерландов представлен клинический случай, в котором у пациентов с меланомой IV стадии после вакцинации дендритными клетками опухоль продолжала прогрессировать, несмотря на то что в организме были обнаружены активированные дендритными клетками опухоль-специфичные Т-лимфоциты. Данные Т-лимфоциты не секретируют необходимые цитокины и не проявляли цитотоксическую активность, что скорее всего связано с

неправильной активацией Т-клеток [Aarntzen et al., 2008]. Всё это приводит к неспособности эндогенно активированных клеток иммунной системы, эффективных на стадии элиминации и равновесия, самостоятельно распознавать опухолевые антигены и противостоять прогрессированию заболевания [Grivennikov et al., 2010].

Обойти возможность развития опухоль-индуцируемой иммунной толерантности позволяет другой подход к использованию потенциала дендритных клеток. В научной литературе представлены примеры применения протоколов *in vitro* стимуляции цитотоксического иммунного ответа дендритными клетками [Bernhard et al., 2008; Курилин и др., 2011; Облеухова и др., 2013; Курилин и др., 2013]. В этих работах ДК получают *in vitro* из моноцитов периферической крови, нагружают антигенами, и затем стимулируют ими популяции цитотоксических Т-лимфоцитов в культуре аутологичных моноклеарных клеток. Использование таких протоколов стимуляции иммунного ответа позволяет совершать адоптивный перенос аутологичных антиген-специфичных ЦТЛ пациентам с онкологическими заболеваниями, при этом обходя механизмы опосредованной опухолью индукции патологической иммунной толерантности [Bernhard et al., 2008].

1.5.3. Методы *ex vivo* нагрузки дендритных клеток опухолевыми антигенами

В исследовательских моделях используют различные пути *ex vivo* нагрузки ДК опухолевыми антигенами [Sabado, Bhardwaj, 2013; Курилин и др., 2013; Ruben et al., 2014]. В литературе представлены случаи использования пассивного захвата дендритными клетками растворимых иммуногенных белков, синтетических и элюированных пептидов [Bernhard et al., 2008], сокультивирования ДК с опухолевым лизатом [Курилин и др., 2013], а также доставки в ДК ДНК- и РНК-конструкций, кодирующих опухолевые антигены [Aarntzen et al., 2012; Kulikova et al., 2015; Sennikov et al., 2016]. Кроме того, используются рекомбинантные

вирусные вектора [You et al., 2006], экзосомы [Schnitzer et al., 2010], апоптотические тела [Frisoni et al., 2005; Ruben et al., 2014].

Все перечисленные методы антигенной нагрузки ДК имеют свои преимущества и недостатки. Преимуществами использования опухолевого лизата является простота выполнения протокола антигенной нагрузки, а также возможность захвата и представления ДК всего спектра антигенных белков. К недостаткам данного метода можно отнести сложность получения клинического материала, поскольку в ряде случаев не представляется возможным выделить опухолевую ткань пациента.

Метод непосредственного культивирования ДК с иммуногенным белком успешно используется в клинических исследованиях клеточных вакцин при раке легкого, почки, лимфоме и миеломе [Berzofsky et al., 2004]. Однако использование белка для антигенной нагрузки не позволяет оценить, как именно произошел процессинг антигена и какие его эпитопы оказались представлены в комплексе с МНС I класса на поверхности дендритных клеток.

Использование ДНК-конструкций позволяет прицельно модулировать иммунный ответ против опухолевых клеток, экспрессирующих данный антиген, при этом в одну плазмиду возможно включение нескольких генов, кодирующих различные эпитопы антигена. Использование моноэпитопных ДНК-конструкций является наиболее специфичным методом нацеливания Т-клеток против раковых клеток. Конструирование полиэпитопных плазмид позволяет получать антигены с рестрикцией по HLA комплексу и стимулировать преимущественно CD8⁺ или CD4⁺ Т-клеточный ответ, или оба одновременно [Sabado, Bhardwaj, 2013]. При этом данный подход требует проведения дополнительного HLA-типирования пациентов.

Генетически-модифицированные дендритные клетки гарантируют, что антиген обрабатывается эндогенно для презентации в комплексе с молекулами МНС I класса, который приводит к эффективной стимуляции цитотоксического противоопухолевого иммунного ответа. Метод использования РНК опухоли удобен в случае, когда не удается определить опухоль-специфичный антиген.

Также, данный способ уменьшает риск возникновения аутоиммунных реакций, т.к. используется только эпитопы опухолевого белка, исключая возможность развития перекрестной реакции на собственные ткани [Palucka et al., 2011].

1.6. Опухоль-ассоциированные антигены

При злокачественном перерождении в клетке происходят значительные морфологические и функциональные перестройки, к которым относится и изменение набора поверхностных рецепторов, что приводит к приобретению клеткой новых антигенных свойств. Поскольку любая опухоль экспрессирует разнообразные белковые антигены, поиск новых опухоль-ассоциированных или опухоль-специфичных антигенов является потенциальной целью противоопухолевой иммунотерапии, а также может способствовать персонализации подходов к лечению онкологических заболеваний.

В настоящее время все выявленные опухолевые антигены можно разделить на два основных типа — опухоль-специфичные антигены и опухоль-ассоциированные антигены [Тюряева, 2008]. Опухоль-ассоциированными антигенами (ОАА) называют антигены, свойственные опухолевым клеткам, и в норме отсутствующие или слабо экспрессированные на клетках тканей взрослого организма [Finn et al., 2009].

Экспрессия ОАА клетками опухоли — спонтанный процесс, хотя в низких концентрациях ОАА могут экспрессироваться и нормальными клетками.

1.6.1. Классификация опухоль-ассоциированных антигенов

В научной литературе приводится следующая классификация опухоль-ассоциированных антигенов [Novellino, 2005; Finn et al., 2009]:

Группа *онкофетальных антигенов* включает молекулы, высокая экспрессия которых наблюдается в течение эмбрионального развития, но прекращается с момента рождения. К этой группе относятся незрелый рецептор ламинина (OFA/iLRP), глипикан 3, α -фетопrotein (α -fetoprotein, AFP) и раково-эмбриональный антиген (cancer embrionic antigen, CEA). На клетках взрослого организма экспрессия антигенов данной группы отсутствует, но возобновляется на опухолевых клетках в случае ряда злокачественных опухолей, при этом остальные клетки организма по-прежнему сохраняют негативный статус экспрессии.

К группе *дифференцировочных антигенов* относятся тканеспецифичные белки или гликопротеины, селективно экспрессируемые определенной тканью, а также опухолями соответствующего гистогенеза. К ним относятся такие антигены как Мелан-А/меланомный антиген, распознаваемый Т-клетками (Melan-A/MART-1), простат-специфичный антиген (ПСА), простат-специфичный мембранный антиген (ПСМА), тирозиназа, гликопротеин-100.

Амплифицированные/гиперэкспрессируемые генные продукты и универсальные опухолевые антигены представляют собой антигены, экспрессируемые на нормальных тканях организма на низком уровне. Однако в клетках злокачественных опухолей они могут быть экспрессированы до стократного превышения нормального уровня. Чрезмерная экспрессия антигенов данной группы послужила причиной использования их в качестве маркеров различных злокачественных новообразований. К ним можно отнести p53, HER2/neu, CEA (Carcinoembryonic antigen) и MUC-1 (Mucin 1). Антигены, высокая экспрессия которых обнаружена в подавляющем большинстве опухолей, объединены в особую подгруппу — универсальные антигены. В группу выявленных универсальных ОАА вошли биомолекулы, синтезирующиеся более

чем в 50 % опухолей с редкой встречаемостью или низким уровнем экспрессии соответствующих им генов в нормальных тканях: TERT, CYP1B1, сурвивин и MDM2 [Gordan, Vonderheide, 2002].

Помимо перечисленных групп ОАА также в отдельную группу выделяют *уникальные антигены* — молекулы, являющиеся продуктами мутаций и реаранжировки экспрессирующихся антигенов.

Термин *«раково-тестикулярные антигены»* (Cancer Testis Antigens, CTA) объединяет группу антигенов человека, которые экспрессируются в опухолях различного гистологического происхождения и практически не экспрессируются в нормальных тканях, за исключением семенников и плаценты [Водолажский и др., 2017]. Первый CTA был определен в меланоме и поэтому назван меланомным антигеном — 1 или MAGE-1 [Hoon et al., 1995]. Позже было установлено, что MAGE-1 экспрессируется во многих других злокачественных опухолях. На сегодняшний день обнаружено более 250 антигенов группы CTA, объединённых в 138 семейств, из которых семь (MAGE-A, BAGE, MAGE-B, GAGE, SSX, LAGE1a, LAGE, MAGE-C) являются наиболее изученными [Кит и др., 2018]. Важно отметить, что поскольку половые клетки не экспрессируют молекул главного комплекса гистосовместимости, презентация антигенов данной группы цитотоксическим Т-лимфоцитам не может быть реализована. Поэтому ОАА данной группы не могут служить мишенью для CD8⁺ противоопухолевого иммунного ответа.

1.6.2. Опухоль-ассоциированный антиген HER2/neu

Белок HER2 (HER2/neu, или ErbB2) — это опухоль-ассоциированный антиген, относящийся к типу универсальных опухолевых антигенов, гиперэкспрессия которого наблюдается в различных типах карцином — раке молочной железы, кишечника, желудка, поджелудочной железы, щитовидой

железы, яичника [Goebel et al., 2002]. Данный антиген является трансмембранным тирозинкиназным рецептором, и имеет несколько вариантов названий в связи с тем, что независимыми группами исследователей были открыты гомологичные гены — ген рецептора ростового фактора у человека (*her*), человеческий гомолог онкогена вируса эритробластомы птиц (*ErbB*) и ген *neu*, который впервые выделен из клеток неоплазмы крысы [Shih et al., 1981; Padhy et al., 1982; Révillion et al., 1998; Шаназаров и др., 2009; Mortenson, Fu, 2013].

Относится к семейству рецепторов эпидермальных факторов роста (EGFR). Семейство состоит из четырех рецепторов: EGFR (Epidermal Growth Factor receptor — рецептор эпидермального фактора роста, ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2/*neu*), ErbB3 (HER3) и ErbB4 (HER4). Белки семейства HER в норме играют важную роль в дифференцировке и росте клеток. Рецептор HER2 наиболее широко экспрессируется в организме, находясь на клетках желудочно-кишечного тракта, легких, молочной и поджелудочной желез, яичника, кожи, центральной нервной системы и мочевыводящей системы эмбриональных и взрослых тканей [Gutierrez, Schiff, 2011]. На мышях с нокаутом гена *Her2/neu* было показано, что отсутствие рецептора приводит к гибели особей на 11 день эмбрионального развития в связи с пороками развития сердца и отсутствием нервной системы [Morris et al., 1999].

Все белки семейства EGFR имеют схожую структуру и представляют собой одноцепочечные трансмембранные гликопротеины, состоящие из внеклеточного лиганд-связывающего эктодомена, трансмембранного домена, короткого околосмембранного участка, тирозин-киназного домена и тирозин-содержащего С-концевого хвоста [Scaltriti, Baselga, 2006; Wieduwilt, Moasser, 2008]. Связывание растворимого лиганда с эктодоменом рецептора способствует образованию гомо- и гетеродимеров между рецепторами. Строение рецепторов семейства EGFR и схема образования гетеродимера отображены на рисунке 1.2.

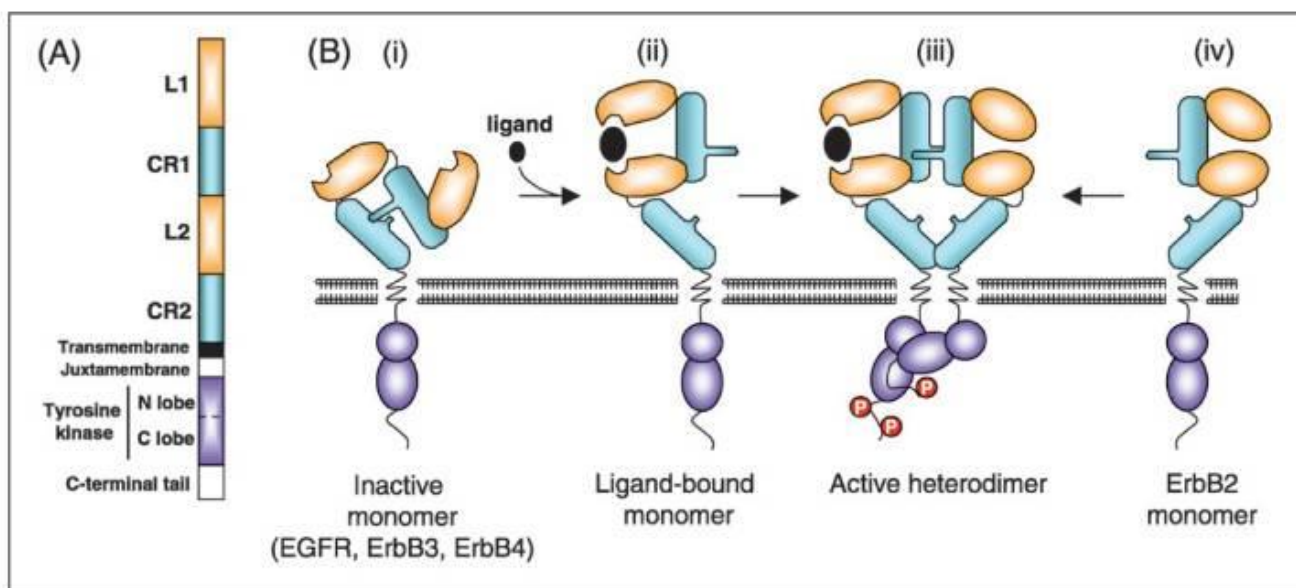


Рисунок 1.2 — Структура рецепторов ErbB [Wieduwilt, Moasser, 2008].

Примечание: (A) Линейное представление рецепторных доменов ErbB. Внеклеточный N-концевой домен содержит четыре субдомена. Богатые лейцином субдомены L1 и L2 непосредственно взаимодействуют с лигандом. Богатый цистеином субдомен CR1 содержит петлю димеризации, ответственную за взаимодействие рецептор-рецептор. Короткий трансмембранный (transmembrane) домен и околосмембранный (juxtamembrane) участок связывает внеклеточный домен с двухъярусным тирозинкиназным доменом (Tyrosine kinase) и С-концевым хвостом (C-terminal tail). (B) Схематический обзор структурной основы димеризации и активации рецептора ErbB. (i) В безлигандном состоянии EGFR, ErbB3 и ErbB4 имеют коническую конформацию, стабилизированную взаимодействием между CR1 и CR2. (ii) Связывание лиганда между L1 и L2 создает расширенную конформацию, которая обнажает петлю димеризации CR1, допускающую гомо- и гетеродимеризацию рецептора. (iii) Димеризация рецептора включает тирозинкиназную N-долю одного рецептора с С-лепестком его партнера, что приводит к фосфорилированию С-терминального тирозина, создавая сайты связывания фосфотирозина для связывания адаптеров, сигнальных молекул и регуляторных белков. (iv) ErbB2 уникален тем, что он зафиксирован в расширенной конформации, готовой к взаимодействию с другими рецепторами ErbB.

Взаимодействие, проявляющееся в гетеродимеризации и трансфосфорилировании, является ключевой особенностью передачи сигналов семейства EGFR. Хотя эти рецепторы являются высоко гомологичными в своих внеклеточных лиганд-связывающих и внутриклеточных киназных доменах, они

расходятся в своих внутриклеточных С-концевых сигнальных хвостах. Это позволяет передавать сигналы по различным эффекторным путям в зависимости от точного репертуара членов семейства EGFR, экспрессируемых в клетках определенного типа и фосфорилированных посредством гетеродимеризационных событий, инициируемых специфическими лигандами [Ruiz-Saenz et al., 2018].

Димеризация рецепторов необходима для активации внутриклеточного домена тирозинкиназы и фосфорилирования С-концевого хвоста [Linggi, Carpenter, 2006]. Затем остатки фосфотирозина активируются аутофосфорилированием [Burgess et al., 2003; Hubbard, 2005], и, как результат, обеспечивает специфические сайты связывания для цитоплазматических белков, содержащих SH2 домен (Src homology 2 domain) и фосфотирозинсвязывающий домен. Эти белки связываются со специфическими остатками фосфотирозина и инициируют внутриклеточную передачу сигналов несколькими путями (рисунок 1.3).

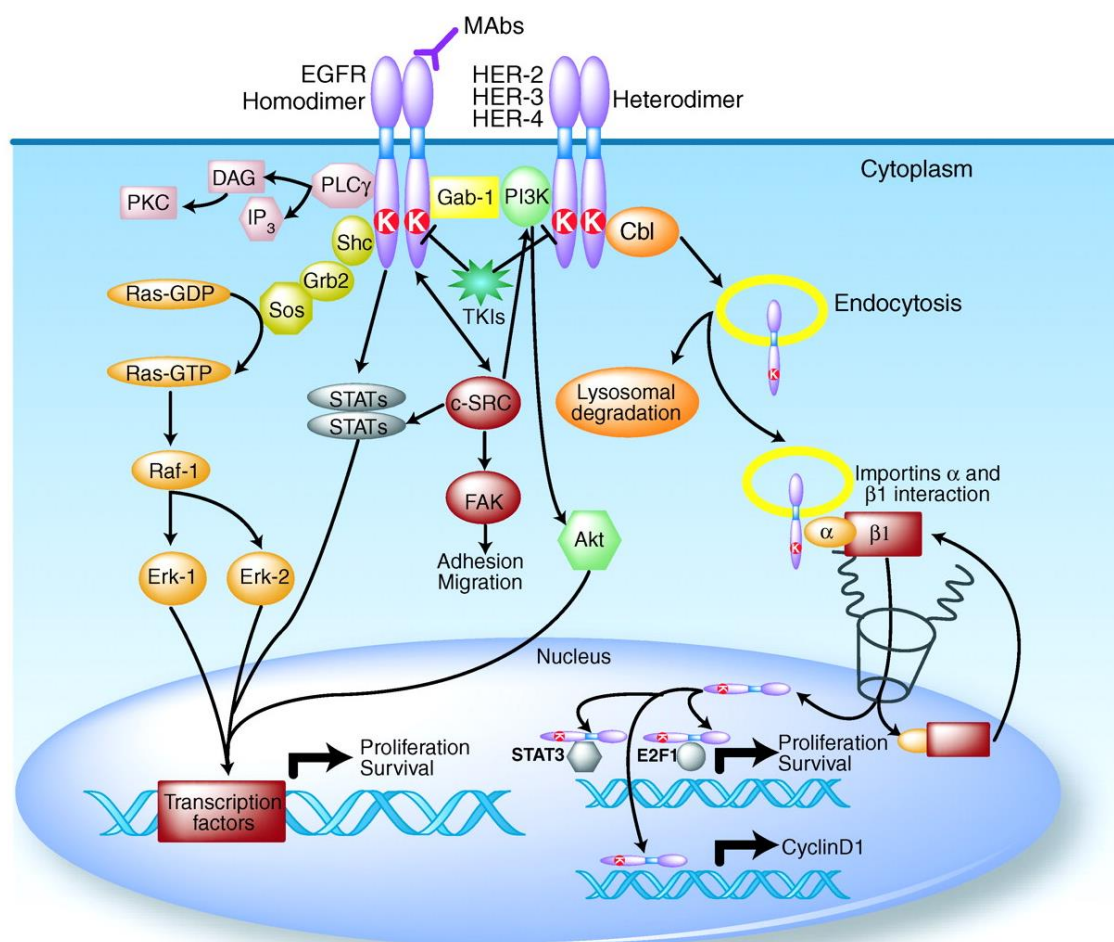


Рисунок 1.3 — Сигнальные пути и ингибиторы рецепторов семейства EGFR [Scaltriti, Baselga, 2006].

Примечание: DAG — 1,2-диацилглицерин; IP₃ — инозитол 1,3,5-трифосфат; PLC γ — фосфолипаза C γ ; Erk-1 — внеклеточная сигнальная регулируемая киназа-1; Erk-2 — внеклеточная сигнальная регулируемая киназа-2; FAK — фокальная адгезионная киназа; PKC — протеинкиназа C.

Фосфолипаза C γ (рисунок 1.3, розовый цвет) и STAT транскрипционные факторы (рисунок 1.3, синий) связываются непосредственно с рецептором (Patterson et al., 2005), тогда как путь Ras/Raf/MAPK (рисунок 1.3, оранжевый) и путь через фосфатидилинозитол-3-киназу (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K) (рисунок 1.3, зеленый) требуют нескольких специфических молекул адаптера (рисунок 1.3, желтый).

В случае Ras/Raf/MAPK пути, после фосфорилирования рецептора EGFR комплекс, образованный адапторными белками Grb2 и Sos, связывается напрямую

или через ассоциацию с адапторной молекулой Shc с конкретными сайтами стыковки на рецепторе [Batzer et al., 1994; Scaltriti, Baselga, 2006]. Это взаимодействие приводит к конформационной модификации Sos, теперь способной рекрутировать Ras-GDP, что приводит к активации Ras (Ras-GTP). Ras-GTP активирует Raf-1, который посредством промежуточных стадий фосфорилирует митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК) внеклеточными сигнально-регулируемыми киназами 1 и 2 [Liebmann, 2001; Scaltriti, Baselga, 2006]. Активированные МАРК импортируются в ядро, где они фосфорилируют специфические транскрипционные факторы, участвующие в пролиферации клеток [Gaestel, 2006].

PI3K представляет собой димерный фермент, состоящий из регуляторной субъединицы p85, ответственной за прикрепление к специфическим для рецепторов сайтам ErbB, и каталитической субъединицы p110, которая генерирует вторичный мессенджер фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат, который ответственен для фосфорилирования и активации протеина серин/треонинкиназы Akt [Vivanco, Sawyers, 2002]. PI3K также может напрямую связываться с любым из партнеров erbB гетеродимеров EGFR [Shaw, Cantley, 2006].

Одновременно активированные рецепторы подвергаются эндоцитозу и следуют двум возможным путям: лизосомальной деградации или импортин-опосредованной ядерной транслокации. Попад в ядро, EGFR может вести себя как собственный фактор транскрипции (для положительной регуляции циклина D1) или как корегулятор других трансаактиваторов генов. Оба пути приводят к ядерной активации генов, связанных с пролиферацией клеток, выживанием, инвазией и метастазированием. Для ингибирования киназы EGFR доступны две основные стратегии: моноклональные антитела (mAb) и низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназы (TKI). mAb действуют внеклеточно, избегая связывания лигандов EGFR, тогда как TKI конкурируют за связывание АТФ с киназным доменом рецептора [Scaltriti, Baselga, 2006].

Известно, что 20-25% случаев рака молочной железы характеризуется гиперэкспрессией белка HER2. Возможные механизмы запуска онкогенеза,

опосредованные гиперэкспрессией HER2/neu представлены в виде схемы на рисунке 1.4.

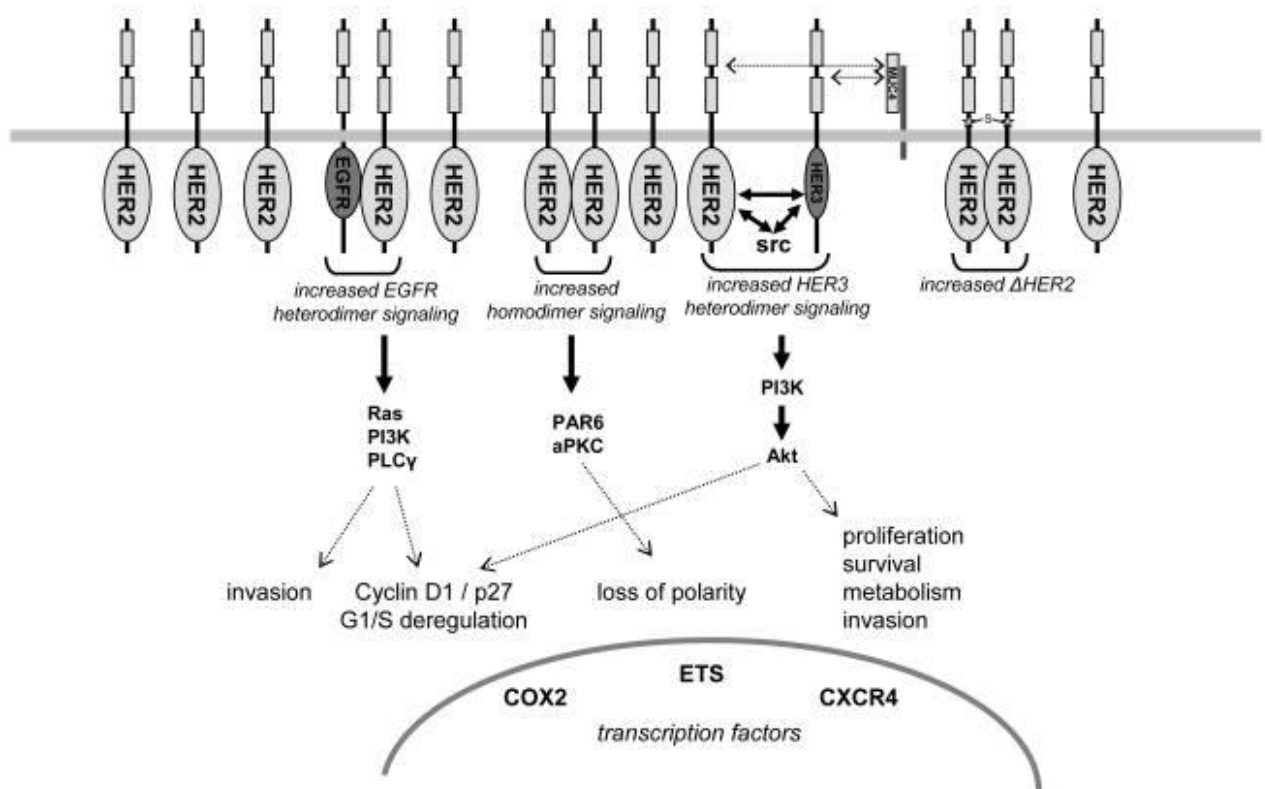


Рисунок 1.4 — Схема сигнальных отклонений, возникающих в результате избыточной экспрессии HER2, которые, согласно существующим гипотезам, способствуют онкогенезу [Moasser, 2007].

Примечание: Сверхэкспрессия HER2 приводит к увеличению всех димеров, содержащих HER2. Увеличение димеров HER2-EGFR стимулирует пролиферативные и инвазивные функции. Увеличение гомодимеров HER2 нарушает клеточную полярность. Увеличение димеров HER2-HER3 влияет на пролиферативные процессы, выживание, инвазивные и метаболические функции. Повышенная экспрессия HER2 приводит к увеличению редкой изоформы HER2 (Δ HER2) с более мощными характеристиками передачи сигналов. В клетках со сверхэкспрессией HER2 индуцируется несколько факторов транскрипции, что приводит к множеству изменений экспрессии генов.

В последние годы накапливается всё больше сведений о роли пути PI3K/Akt в регуляции многочисленных клеточных процессов, имеющих первостепенное значение для онкогенного роста, а также о роли HER3 как фактора, необходимого для запуска этого пути [Ruiz-Saenz et al., 2018]. В частности, экспериментальные исследования последнего десятилетия выявили HER3 в качестве критического

партнера для HER2 в генезе и прогрессировании HER2-амплифицированных раков. Несколько моделей нокдауна или делеции генов показывают, что HER2-управляемые опухоли не развиваются или не растут в отсутствие экспрессии HER3 [Vaught et al., 2012; Ruiz-Saenz et al., 2018].

Гиперэкспрессия рецептора или амплификация онкогена HER2 ассоциированы с наиболее агрессивным фенотипом данного типа опухоли, более коротким периодом до рецидива после первичного лечения и с ухудшением показателей выживаемости [Subbiah, Gonzalez-Angulo, 2013]. Показано, что HER-2 является патологическим биомаркером, отличающим раковые клетки молочной железы от неопухолевых, так как экспрессия белка HER2 на поверхности клеток HER2-гиперэкспрессирующего рака молочной железы может в 50-100 раз превышать экспрессию этого белка в нормальных клетках. Важно, что это биологическое свойство HER2 сделало его идеальной мишенью для терапии против HER2-гиперэкспрессирующих опухолей молочной железы [Dev et al., 2013]. Фундаментальная роль HER2 в запуске сигнального каскада, приводящем к росту опухоли, определяет вектор развития терапии рака молочной железы в сторону нацеливания против данного антигена. Примерами терапий, нацеленных против данного антигена, являются терапия антителами Трастузумаб, ингибирующими гиперэкспрессию HER2, а также адоптивный перенос HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов [Mir et al., 2007; Bernhard et al., 2008].

Обобщая приведенные литературные данные, можно сделать вывод, что для эффективной активации специфического противоопухолевого иммунного ответа необходимо отлаженное взаимодействие нескольких ключевых звеньев иммунной системы и выполнение сразу нескольких условий. В частности, не должны быть нарушены процессы созревания и антигенной нагрузки дендритных клеток, процессы антиген-зависимой дифференцировки и пролиферации цитотоксических Т-лимфоцитов, а также количественное соотношение популяций антиген-специфичных Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти. Можно заключить также, что выполнение данных условий обеспечивают следующие факторы: отсутствие

иммуносупрессирующего влияния опухоли и её микроокружения на иммунокомпетентные клетки, правильный выбор антигенных детерминант для активации специфического иммунного ответа (эпитопы, представляемые дендритными клетками, должны быть иммуногенными, опухолевый антиген должен быть высоко экспрессирован на клетках опухоли), а также достаточность цитокиновой стимуляции цитотоксических Т-лимфоцитов.

Таким образом, можно предположить, что создание подхода, комбинирующего протокол стимуляции противоопухолевого иммунного ответа в условиях *in vitro* с использованием дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными конструкциями, кодирующими антигенные детерминанты опухолевых клеток, и последующим выделением популяций антиген-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов представляет интерес как в фундаментальном аспекте, для изучения особенностей фенотипа, функций и популяционного состава *in vitro*-генерируемых цитотоксических Т-клеток конкретной антигенной специфичности, так и в практическом плане, поскольку данный подход может служить основой для создания технологии получения Т-клеточных препаратов для адаптивного переноса онкологическим пациентам.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Среда и реагенты

Среды и компоненты: культуральные среды RPMI-1640, DMEM («Биолот», Россия), EMEM (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия), эмбриональная телячья сыворотка (fetal calf serum, FCS) (Hyclone, США), бычий сывороточный альбумин (bovine serum albumin, BSA), гуанидин тиоцианат, 2-β-меркаптоэтанол (Fluka, Швейцария), L-глутамин (Биолот, Россия), буферный раствор HEPES, FITC-декстран, саркозил, цитрат натрия (Sigma, США), гентамицин (KRKA, Словения), ампициллин (Синтез, Россия), фиколл (Pharmacia Fine Chemical, Швеция), урографин (Шеринг, Германия), раствор трипсина, раствор Версена (Биолот, Россия), агароза (Медиген, Россия), полимеразы Hot Start Taq DNA polymerase, маркеры молекулярного веса ДНК 100bp, pUC19/Msp I (Сибэнзим, Россия), диэтилпирокарбонат (0,01%) (Serva, Германия).

Рекомбинантные человеческие цитокины: rhIL-4 (recombinant human Interleukin-4, интерлейкин-4), rhGM-CSF (recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), rhTNF-α (recombinant human tumor necrosis factor-alpha, фактор некроза опухоли-α) (Peprotech, США), rhIL-2, rhIL-7, rhIL-15 (Biovision, США).

Моноклональные антитела и красители для проточной цитометрии: anti-human CD3-FITC, anti-human CD14-PE, anti-human HLA-DR-FITC, anti-human CD11c-PE, anti-human CD209-PerCP-Cy5.5, anti-human CD86-FITC, anti-human CD83-PE (Becton Dickinson, США), anti-human CD8-APC, anti-human CD14-FITC (eBioscience, США), anti-human CD8-Brilliant-Violet-510, anti-human CD28-FITC, anti-human CD27-PerCP, anti-human CD95-PE-Cy7, anti-human CD127-APC, anti-

human CD62L-APC-Cy7, anti-human CD45RA-Pacific-Blue (Biolegend, США), иодид пропидия (Sigma, США), CFSE (Molecular probes, США).

Реагенты для окрашивания и изоляции антиген-специфичных Т-клеток: Strep-Tactin-APC, Strep-Tactin-PE, МНС I-Strep HLA-A*0201 HER2/neu, МНС I-Strep HLA-A*0201 HER2/neu, раствор D-биотина (D-Biotin stock solution), буферный раствор IS buffer, магнитные частицы Strep-Tactin Magnetic Nanobeads (Iba, Германия).

Материалы для магнитной трансфекции: магнитные наночастицы «МАТга-А», универсальная магнитная плата для проведения магнитной трансфекции, 26×26 см (PromoKine, США).

Расходные материалы: вакуумные пробирки с литий-гепарином (Improvacuter, Китай), культуральные флаконы с поверхностями роста площадью 25 см², 75 см² и 150 см², чашки Петри с поверхностями роста площадью 60,1 см², 96-луночные круглодонные культуральные планшеты, культуральные скребки для работы с клеточными культурами (TPP, Швейцария), 48-луночные культуральные планшеты (Costar, США), пробирки «Falcon» объемом 15 мл и 50 мл, полистироловые цитометрические пробирки (Axygen, США), магнитные колонки MS Columns (Miltenyi Biotec, Германия).

Готовые коммерческие наборы: набор для HLA генотипирования низкого разрешения по локусу А «ALLSET™ GOLD HLA A LOW RES SSP» (Invitrogen, США), набор для нуклеофекции «Амаха Human Dendritic Cell Nucleofector Kit» (Lonza, Швейцария), набор для иммуноферментного анализа (ELISA) «γ-ИНТЕРФЕРОН-ELISA-БЕСТ» (Вектор-Бест, Россия), набор БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (2×) (ООО «Биолабмикс», Россия) для проведения обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени одношаговым методом.

2.2. ДНК-конструкции

Плазмида HER2 — полиэпитопная ДНК-конструкция **pMax-2epitope**, кодирующая по несколько копий каждого из двух целевых эпитопов в разных молекулярных контекстах. Целевыми эпитопами являлись два иммуногенных эпитопа опухоль-ассоциированного антигена HER2/neu: HER2 p369–377 (эпитоп E75, KIFGSLAFL) и HER2 p689-697 (E88, RLLQETELV). ДНК-конструкция была наработана в препаративном формате и очищена от эндотоксинов с подтверждением правильности нуклеотидной последовательности секвенированием. Структура сконструированной ДНК-конструкции приведена на рисунке 2.1.

MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKE
STLHLVLRRLRGVSGKIFGSLAFLKIFGSLAFLRLLQETELVKIFGSLAFLRLLQETELVRLLQE
 TELVAAYKIFGSLAFLAAYKIFGSLAFLAAYRLLQETELVAAYKIFGSLAFLAAYRLLQETELV
 AAYRLLQETELV

Рисунок 2.1 — Аминокислотная последовательность ДНК-конструкции pMax с N-концевым убиквитином. N-концевой убиквитин подчеркнут; С-концевой G в убиквитине заменен на V, чтобы устранить сайт расщепления протеазами.

Плазмида p5 — контрольная плазмидная ДНК-конструкция **pDNA5-BC-C**, кодирующая белок Ag51, не являющийся опухолевым антигеном.

2.3. Объект исследования

Объектом исследования являлись мононуклеарные клетки периферической крови (МНК ПК) HLA-A*02-позитивных условно-здоровых доноров (18 человек; половозрастная характеристика приведена в таблице 2.1) и HLA-A*02-позитивных

пациентов с подтвержденным диагнозом HER2-положительного рака молочной железы (РМЖ), проходивших лечение в онкологическом отделении №3 МБУЗ ГКБ №1 города Новосибирска (12 человек).

Таблица 2.1 — Характеристика HLA-A*02-положительных условно-здоровых доноров.

Пол	Ж — 66,7% (12/18) М — 33,3% (6/18)
Возраст, полных лет	Медиана — 42 (34 — 60)

Критериями включения пациентов в исследование являлись наличие диагноза HER2-положительного рака молочной железы (РМЖ), подтвержденное медицинской документацией, для пациентов, и наличие аллели HLA-A*02 по результатам генотипирования для пациентов и условно-здоровых доноров. Характеристика пациентов, кровь которых была отобрана для участия в исследовании по результатам HLA генотипирования (4 человека), приведена в таблице 2.2.

Таблица 2.2 — Характеристика HLA-A*02-положительных пациентов.

Пол	Возраст, полных лет	Диагноз на момент исследования	HER2-статус
Ж.	29	T _x N ₃ M ₀	3+
Ж.	62	T ₂ N ₃ M ₀ после комплексного лечения, ремиссия.	3+
Ж.	65	T _x N ₂ M ₀	3+
Ж.	49	T ₂ N ₂ M _{0/+} (м/ткани) после комплексного лечения в 2013г., прогрессирование, после лечения.	3+

Исследование проводилось с добровольного информированного согласия всех доноров и пациентов, одобрено локальным этическим комитетом НИИФКИ (протокол №111 от 6.11.2018). МНК ПК пациентов были использованы в настоящем исследовании в качестве группы сравнения для оценки относительного

содержания цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к исследуемым эпитопам опухоль-ассоциированного антигена HER2/neu, в лимфоцитарном пуле МНК ПК условно-здоровых доноров и пациентов с HER2-позитивным РМЖ в анамнезе.

Общий план эксперимента, проведенного на МНК ПК условно-здоровых доноров, представлен в виде схемы на рисунке 2.2.



Рисунок 2.2 — Общая схема экспериментальной части работы с моноклеарными клетками крови условно-здоровых доноров.

2.4. Генотипирование для выявления аллеля HLA-A*02

Генотипирование по локусу А HLA проводилось на начальных этапах исследования для отбора доноров и пациентов, позитивных по экспрессии HLA A*02, а также для подбора HLA A*02⁺ опухолевой клеточной линии человека, экспрессирующей антиген HER2/neu.

Для HLA-генотипирования опухолевых линий-кандидатов на роль мишени для цитотоксических Т-лимфоцитов клетки линий BT-474, ZR-75/1 и MCF-7 были предварительно разморожены стандартным методом с отмывкой от криоконсерванта. Для культивирования опухолевых линий использовалась среда RPMI-1640, дополненная 10% FCS, 2 mM L-глутамина, 5×10^{-5} mM меркаптоэтанол, 25 mM HEPES, 80 мкг/мл гентамицина, 100 мкг/мл ампициллина, 10 мкг/мл инсулина. Перед выделением ДНК для HLA-генотипирования размороженные опухолевые клетки подвергались 4-5 пассажам в культуральных флаконах с поверхностью роста 25 см². Пассирование проводилось каждые 3-4 дня по достижении высокой плотности опухолевых клеток с образованием монослоя. Снятие клеток производилось с использованием раствора трипсина-Версена (раствор трипсина 0.25%, раствор Версена 0.02%) в соотношении 1:3).

Для HLA-генотипирования образцов ДНК доноров и пациентов использовалась цельная периферическая венозная кровь, предварительно забранная в вакуумные пробирки с литий-гепарином.

ДНК для генотипирования выделяли из проб цельной крови доноров и пациентов, а также из клеток опухолевых линий MCF-7, BT-474 и ZR-75/01 стандартным методом фенол-хлороформной экстракции [Маниатис, 1984].

Генотипирование по локусу А HLA проводили методом амплификации участков генов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием коммерческого набора для HLA генотипирования низкого разрешения по локусу А «ALLSET™ GOLD HLA A LOW RES SSP» по протоколу изготовителя. Идентификация амплифицированных фрагментов ДНК производилась с помощью

гель-электрофореза на 2% агарозном геле. Для гель-электрофореза использовались маркеры молекулярного веса ДНК M16, pUC19/Msp I, трис-ацетатный буфер (10 mM $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, 0,1 mM EDTA). Типичные электрофореграммы, полученные в результате HLA генотипирования, представлены на рисунке 2.3.

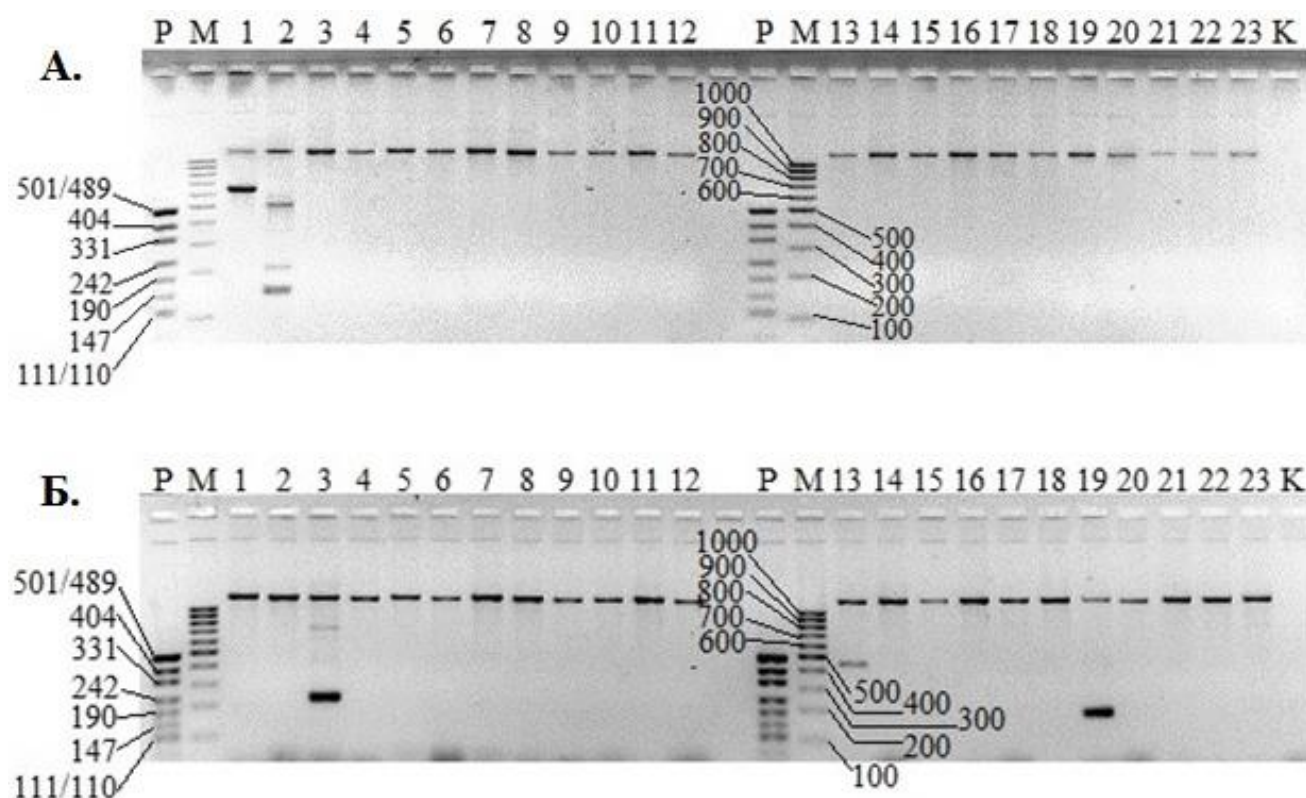


Рисунок 2.3 — Типичные электрофореграммы образцов ДНК, генотипированных по локусу A HLA.

Примечание: P, M — ДНК-маркеры (каждый представлен на двух дорожках — слева и посередине геля, для удобства оценки молекулярного веса фрагментов ДНК); P — маркер pUC19/Msp I, M — маркер 100bp (10 фрагментов от 100 до 1000 bp); 1-23 — клоны; K — контроль контаминации. А. — Электрофореграмма ДНК донора, несущего аллель HLA-A*02. Полосы на 1 и 2 дорожках геля указывают на наличие аллелей HLA-A*02 и HLA-A*01. Б. — Электрофореграмма ДНК донора, не несущего аллель HLA-A*02. Полосы на 3, 13 и 19 дорожках геля указывают на наличие аллелей HLA-A*03 и HLA-A*32(19).

2.5. Выделение моноклеарных клеток из цельной периферической крови.

Для культивирования моноклеарных клеток использовалась среда RPMI-1640, дополненная 10% FCS, 2 мМ L-глутамина, 5×10^{-5} мМ меркаптоэтанола, 25 мМ HEPES, 80 мкг/мл гентамицина и 100 мкг/мл ампициллина (далее — среда для культивирования).

Венозную кровь условно здоровых доноров и пациентов, несущих аллель HLA-A*02, забирали в вакуумные пробирки с литий-гепарином. МНК ПК выделяли по стандартной методике [Boyum, 1968] на градиенте плотности фиколла-урографина. Весь объем взятой крови разводили средой RPMI-1640 в соотношении 2:1. Затем по 35 мл разбавленной крови наслаивали на 15 мл раствора фиколла-урографина ($\rho=1,077$ г/л), центрифугировали при 1500 об/мин в течение 40 минут. По окончании центрифугирования МНК ПК собирали из образовавшейся интерфазы и переносили в среду RPMI-1640. Для удаления примеси фиколла-урографина клетки дважды отмывали путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 минут и последующего ресуспендирования в 15 мл среды RPMI-1640.

2.6. Получение прилипающей и неприлипающей фракций моноклеарных клеток. Получение незрелых дендритных клеток из моноцитов прилипающей фракции МНК

Фракционирование моноклеарных клеток на моноцитарный и лимфоцитарный пул производилось путем инкубации на пластике для отделения фракции клеток с высоким уровнем адгезии к пластику (прилипающая фракция — моноциты) от фракции клеток с низкой адгезионной способностью (неприлипающая фракция — лимфоциты). Для этого выделенные МНК ПК инкубировали в пластиковой культуральной посуде (культуральные флаконы,

чашки Петри) в концентрации 2×10^6 /мл в течение 30 минут, во влажной атмосфере при температуре 37 °С и концентрации CO₂ 5%. По окончании инкубации среду с неприлипающими клетками собирали в пробирки для центрифугирования, после чего поверхность культурального флакона с прилипающей фракцией МНК ополаскивали средой и механически снимали клетки с пластика культуральным скребком. Суспензии с фракциями прилипающих и неприлипающих МНК центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 минут. Клеточные осадки ресуспендировали в 1 мл среды для культивирования, после чего производили подсчет количества клеток обеих фракций с 5% уксусной кислотой в камере Горяева.

Фракцию неприлипающих МНК затем разводили средой для культивирования до концентрации 2×10^6 /мл и помещали в культуральные флаконы (75 см²) для дальнейшего культивирования в течение 5 суток, до проведения процедуры сокультивирования. На третьи сутки культивирования производилась замена половины объема культуральной среды.

Для стимуляции дифференцировки моноцитов прилипающей фракции МНК в незрелые дендритные клетки (нДК), клетки прилипающей фракции МНК культивировали в концентрации 1×10^6 /мл в чашках Петри во влажной атмосфере, при 5% CO₂ и 37 °С, в среде для культивирования с добавлением GM-CSF (50 нг/мл) и IL-4 (100 нг/мл), в течение 4 суток, с заменой половины объема среды для культивирования с цитокинами на 2 сутки.

2.6.1. Оптимизация метода выделения прилипающей фракции МНК

Оптимизация условий выделения моноцитарной фракции МНК, описанных выше, производилась следующим образом. Оптимизируемыми параметрами являлись тип обработки поверхности пластиковой культуральной посуды и время инкубирования клеток для адгезии. Адгезию клеток производили, соответственно,

на пластик без дополнительной обработки, а также на пластик, покрытый бычьим сывороточным альбумином. Для обработки поверхности в лунки планшета вносили 150 мкл 1% BSA и выдерживали в термостате при 37 °C в течение 30 минут. Далее жидкость из лунок удаляли, вносили суспензию МНК в концентрации 2×10^6 /мл по 250 мкл на лунку и инкубировали в CO₂-инкубаторе (37 °C, 5% CO₂, 100% влажность). Время инкубации варьировали: 30, 60 и 120 минут. По истечении времени инкубации суспензию с неприлипающими МНК собирали в отдельные полистироловые цитометрические пробирки, после чего к адгезированным клеткам добавляли по 500 мкл среды RPMI-1640 и механически снимали с пластика. Суспензии с прилипающими МНК также переносили в цитометрические пробирки для дальнейшего анализа.

Эффективность протоколов выделения моноцитов при разных условиях оценивали по изменению процента CD14⁺ моноцитов в образцах прилипающих и неприлипающих МНК, который оценивался методом проточной цитометрии. Клетки в цитометрических пробирках двукратно отмывали путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 минут в 1 мл PBS (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ × 12H₂O, 1,47 mM KH₂PO₄, 0,53 mM EDTA и 0,1% NaN₃). После второй процедуры отмывки клетки инкубировали 30 мин в 20 мкл PBS с добавлением антител anti-human CD14-FITC в количестве, рекомендованном производителем, при комнатной температуре, в защищенном от света месте. Далее клетки отмывали от несвязавшихся антител в 2 мл PBS, центрифугировали 10 минут при 1500 об/мин, ресуспендировали в 100 мкл PBS и проводили анализ на проточном цитометре BD FACSVerse (Becton Dickinson, США).

2.7. Трансфекция незрелых дендритных клеток. Стимуляция созревания трансфицированных дендритных клеток.

Для нагрузки дендритных клеток опухоль-ассоциированным антигеном HER2/neu использовался метод нуклеофекции на приборе Nucleofector 2b (Lonza, Швейцария), с использованием коммерческого набора Amaxa Human Dendritic Cell Nucleofector Kit и ДНК-конструкции pMax-2epitope, кодирующей эпитопы E75 и E88 антигена HER2/neu. Процедура нуклеофекции проводилась согласно протоколу производителя. После завершения процедуры антигенной нагрузки незрелые ДК, трансфицированные ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы антигена HER2/neu, культивировались в среде для культивирования с добавлением 25 нг/мл TNF α (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия) в концентрации 1×10^6 /мл в культуральных флаконах с поверхностью роста 25 см² в течение 48 часов для стимуляции созревания трансфицированных ДК.

На стадии оптимизации протокола антигенной нагрузки дендритных клеток была проведена серия экспериментов по магнитной трансфекции и нуклеофекции ДК плазмидой pMaxGFP, входящей в состав набора Amaxa Human Dendritic Cell Nucleofector Kit, для сравнения эффективности данных методов доставки ДНК-конструкции. Эффективность доставки плазмиды в обоих случаях оценивалась по продукции флуоресцентного белка GFP, закодированного в плазмиде: количество GFP-позитивных клеток оценивали на проточном цитометре BD FACSVerse через 24 часа после проведения трансфекции дендритных клеток. Для определения жизнеспособности трансфицированной клеточной культуры непосредственно перед цитометрическим анализом к клеткам добавляли по 1 мкг/мл пропидия иодида (propidium iodide, PI).

Процедура магнитной трансфекции ДК плазмидой pMaxGFP осуществлялась с помощью реактивов фирмы Promokine согласно протоколу производителя.

2.8. Фенотипирование дендритных клеток и оценка их функциональной активности

Оценку фенотипа ДК проводили методом проточной цитометрии на приборе BD FACS Aria (Becton Dickinson, США), с использованием соответствующих моноклональных антител, меченых флуорохромами: anti-human CD3-FITC, anti-human CD14-PE, anti-human HLA-DR-FITC, anti-human CD11c-PE, anti-human CD209-PerCP-Cy5.5, anti-human CD86-FITC, anti-human CD83-PE, согласно инструкциям изготовителя.

В качестве критерия функциональной активности ДК оценивали их способность к рецептор-опосредованному эндоцитозу с помощью захвата FITC-декстрана. Для этого к $0,1 \times 10^6$ исследуемых клеток в 100 мкл среды добавляли по 5 мкл раствора FITC-декстрана (0,5 мг/мл) и инкубировали в течение 1 часа, при температуре +37 °C и +4 °C, соответственно. После инкубации к клеткам добавляли по 100 мкл раствора трипанового синего (0,5 мг/мл) для подавления поверхностной неспецифической флуоресценции, после этого проводилась инкубация в течение 5 минут при +4 °C и клетки дважды отмывались путем центрифугирования в PBS, содержащим 0,02% EDTA и 1% азида натрия [Obermaier et al., 2003]. Анализ меченых клеток проводили при помощи проточного цитометра BD FACSVerse в регионе больших гранулярных лейкоцитов.

2.9. Получение активированных HER2-специфичных Т-лимфоцитов

Для получения HER2-специфичных Т-лимфоцитов культура МНК, истощенная по моноцитарной фракции (неприлипающие МНК), подвергалась совместному культивированию со зрелыми дендритными клетками (зДК), трансфицированными, соответственно, контрольной и опытной ДНК-

конструкциями. Совместное культивирование в культуральных флаконах проводилось в соотношении МНК : ДК, равном 10 : 1 и конечной концентрации 1 млн/мл, в среде для культивирования, в течение 5 суток с заменой половины объема среды для культивирования на 3 сутки.

2.10. Окрашивание стрептамерами и идентификация HER2-специфичных Т-лимфоцитов

Для выявления популяции HER2-специфичных Т-лимфоцитов в совместной культуре МНК и ДК клетки на 5 сутки совместного культивирования окрашивались комплексом для окрашивания антиген-специфичных Т-клеток по технологии Streptamer (Iba, Германия), после чего окрашенные пробы дополнительно метились антителами для фенотипирования цитотоксических Т-клеток и затем анализировались методом проточной цитометрии на приборе BD FACS Verse. Все этапы процедуры окрашивания клеток стрептамерами проводились при температуре +4 °С.

Для образования окрашивающего комплекса следующие реагенты смешивали в указанных количествах: для окрашивания 1×10^6 клеток 1,6 мкл МНС и 2 мкл Strep-tactin PE или Strep-tactin APC инкубировали в буферном растворе IS buffer, в конечном объеме 20 мкл. В качестве контроля на неспецифическое связывание использовались клетки, инкубированные с комплексом, состоящим только из 2 мкл реагента Strep-tactin PE (или из 2 мкл реагента Strep-tactin APC, соответственно), разведенного буфером IS до конечного объема 20 мкл. Полученные комплексы инкубировали в течение 45 минут при температуре +4 °С. По окончании времени инкубации комплекс добавляли к клеткам, предварительно собранным из культуральной посуды и однократно отмытым в буфере IS путем центрифугирования в течение 10 мин при 1500 об/мин и температуре +4 °С на центрифуге Jouan MR23i (Thermo Fisher Scientific, США). Клетки с комплексом

инкубировали в течение 45 мин при температуре +4 °С. По истечении времени инкубации клеток с комплексом реакция останавливалась добавлением в реакционную смесь 200 мкл IS buffer. Клетки дважды отмывали в 200 мкл IS buffer.

2.11. Фенотипирование цитотоксических Т-лимфоцитов

Совместные культуры МНК и ДК, окрашенные РЕ-конъюгированными стрептамерами, метились затем следующими моноклональными антителами для проточной цитометрии: CD8-Brilliant-Violet-510, anti-human CD28-FITC, anti-human CD27-PerCP, anti-human CD95-PE-Cy7, anti-human CD127-APC, anti-human CD62L-APC-Cy7, anti-human CD45RA-Pacific-Blue. Для этого к пробам streptamer-РЕ-меченных клеток, ресуспендированных в 50 мкл холодного PBS, добавляли комбинации указанных антител, в количествах, рекомендованных фирмой-производителем, и инкубировали их в темноте при температуре +4 °С в течение 40 мин. По истечении времени инкубации реакцию связывания с антителами останавливали добавлением 1 мл PBS и центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин и температуре +4 °С. К клеточным осадкам добавляли 200 мкл холодного PBS и анализировали полученные пробы на проточном цитометре BD FACSVersе.

Совместные культуры МНК и ДК, окрашенные APC-конъюгированными стрептамерами, метились моноклональными антителами CD8-Brilliant-Violet-510 и анализировались на проточном цитометре при одинаковых параметрах вольтажа фотоэлектронного умножителя по APC-детектору для сравнения уровня поверхностной экспрессии Т-клеточных рецепторов у E75-специфичных и E88-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов.

2.12. Изоляция HER2-специфичных Т-лимфоцитов

Выделение HER2-специфичных Т-лимфоцитов производилось методом магнитной сортировки на колонках MS Columns. Для мечения HER2-специфичных Т-лимфоцитов использовались магнитные частицы Strep-Tactin Nano Beads, а также реагенты MHC I-Strep HLA-A*0201 KIFGSLAFL, MHC I-Strep HLA-A*0201 RLLQETELV, раствор IS buffer, D-Biotin.

Магнитная сортировка производилась по протоколу производителя с модификациями исследователей. Для очистки выделенных клеток от магнитных частиц элюированную фракцию антиген-специфичных клеток центрифугировали в течение 10 мин при +4 °C, при 1400 об/мин, после чего клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл 1 mM D-Biotin и инкубировали в течение 15 мин при температуре +4 °C. Затем клетки центрифугировали в течение 10 мин при +4 °C, при 1400 об/мин, повторно инкубировали с 1 mM D-Biotin, и снова центрифугировали. Клеточный осадок ресуспендировали в 400 мкл среды для культивирования, считали количество и жизнеспособность клеток в камере Горяева, с использованием окрашивания эритрозином, и затем раскапывали по 100 мкл в лунки 96-луночного планшета для дальнейшего культивирования.

2.13. Стимуляция пролиферации HER2-специфичных Т-лимфоцитов и оценка эффективности магнитной сортировки

Для эффективной наработки количества выделенных HER2-специфичных Т-лимфоцитов, необходимого для использования в дальнейших экспериментах, был поставлен эксперимент по подбору оптимальных концентраций цитокинов, необходимых для стимуляции пролиферативной активности Т-лимфоцитов. Производилось титрование концентраций цитокинов по пролиферации CD8⁺ Т-

лимфоцитов периферической крови здоровых доноров, предварительно меченных флуоресцентным витальным красителем CFSE.

Для выделения популяции $CD8^+$ лимфоцитов МНК ПК условно-здоровых доноров окрашивали антителами anti-human $CD8$ -Brilliant Violet 510 путем инкубирования в темноте в течение 30 мин при комнатной температуре и последующей отмывки путем центрифугирования при 1500 об/мин в 1,5 мл PBS. Выделение $CD8^+$ клеток проводили с помощью проточного клеточного сортера BD FACSAria (скорость сортировки: $5-7 \times 10^3$ событий/сек; эффективность сортировки: 93-95%; чистота сортировки: 98-99%).

Мечение отсортированной популяции $CD8^+$ клеток CFSE проводилось следующим образом. Цитотоксические Т-лимфоциты в количестве 5×10^6 клеток ресуспендировали в 0,5 мл 25 мМ PBS с 0,1% BSA и добавили 2 мкМ CFSE. Инкубировали клетки с CFSE при 37 °C 10 мин при периодическом встряхивании. Затем добавляли 5-кратный объем холодной среды RPMI-1640 с 10% FCS, и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 минут. После центрифугирования супернатант удаляли и еще дважды повторно отмывали клетки в 5 мл холодной среды RPMI-1640 с 10% FCS. После последней отмывки супернатант удаляли и клеточный осадок ресуспендировали в среде для культивирования с добавками до концентрации 1 млн/мл.

Меченные CFSE $CD8^+$ лимфоциты культивировали 5 суток в условиях 37 °C, 5% CO_2 . Анализ пролиферативной активности проводили на проточном цитометре BD FACSVersе. Выделяли регион лимфоцитов на точечной диаграмме прямого и бокового светорассеивания, и на гистограмме флуоресценции CFSE выделяли интервальный гейт клеток, прошедших стадии клеточного деления.

По результатам проведенного титрования концентраций цитокинов были выбраны оптимальные сочетание и концентрация цитокинов: на этапе наработки необходимого количества антиген-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов целевую фракцию клеток после магнитной сепарации культивировали в 96-луночном планшете в концентрации 1 млн/мл в среде для культивирования, в присутствии цитокинов rhIL-7 (50 нг/мл), rhIL-15 (50 нг/мл) и rhIL-2 (50 нг/мл) в

течение 10-14 суток, с заменой половины объема среды и повторным добавлением цитокинов через каждые 3-4 суток.

После процедуры стимуляции пролиферации выделенных клеток был произведен анализ содержания клеток, несущих поверхностный маркер CD8, путем мечения клеток антителами CD8-APC и анализа на проточном цитометре BD FACS Verse.

2.14. Оценка экспрессии гена *ErbB2* в клетках опухолевой линии MCF-7

Наличие экспрессии гена *ErbB2* в клетках линии MCF-7 определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с помощью набора БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (2×) (ООО «Биолабмикс», Россия). Набор предназначен для проведения обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени одношаговым методом. Для этого из клеток линии MCF-7 двух разных пассажей была выделена суммарная клеточная РНК методом фенольной экстракции [Chomczynski, Sacchi, 1987]. Подробнее, клетки линии MCF-7 лизировали денатурирующим раствором (4 М гуанидин тиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, pH 7,0; 0,5% саркозил; 0,1 М 2-β-меркаптоэтанол из расчета 100 мкл денатурирующего раствора на 1×10^6 клеток. Затем последовательно добавляли 0,1 объема 2 М ацетата натрия (pH 4,0) 1 объем насыщенного водой фенола и 0,2 объема смеси «хлороформ : изоамиловый спирт» (49:1). Перед добавлением очередного компонента лизат тщательно перемешивали, переворачивая пробирки. Конечную суспензию интенсивно встряхивали на шейкере в течение 15 секунд, затем инкубировали на льду 15 мин. После инкубирования образцы 20 мин центрифугировали для разделения фаз при 10000g. Водную фазу отбирали, добавляли к ней равный объем изопропанола и помещали на -20°C для преципитации РНК. После повторного

центрифугирования в течение 20 мин. при 10000 g получившийся осадок РНК дважды отмывали в 75% этаноле. РНК осаждали центрифугированием в том же режиме. Осадок растворяли в деионизованной воде, обработанной диэтилпиروкарбонатом (0,01%).

Для проведения ОТ-ПЦР использовали следующий состав реакционной смеси объемом 25 мкл: 2х буфер для ОТ-ПЦР с SYBR, 25х Биомастермикс (смесь М-MuLV –РН ревертазы и HS-Taq ДНК-полимеразы), 300 nM каждого праймера, 1 ng РНК. Для реакции использовали праймеры для синтеза *ErbB2*: прямой 5'-GGGAAGAATGGGGTTCGTCAAA-3', *ErbB2* обратный 5'-CTCCTCCCTGGGGTGTCAAGT-3' [Ariazi et al., 2002; Lu et al., 2011; Jung et al., 2014].

Программа амплификации (амплификатор BioRad CFX96 Touch): 45 °C — 10 мин, 95 °C — 5 мин; 45 циклов: 95 °C — 10 сек, 60 °C — 10 сек, 72 °C — 15 сек (режим чтения плашки), 80 °C — 3 сек (режим чтения плашки); шаг построения кривых температур плавления: 65 — 95 °C.

Идентификация амплифицированных фрагментов ДНК для обнаружения искомого продукта производилась с помощью гель-электрофореза на 1,5% агарозном геле. Для гель-электрофореза использовались маркеры молекулярного веса ДНК 100bp (10 фрагментов от 100 до 1000 bp) и pUC19/Msp I, трис-ацетатный буфер (10 mM (HOCH₂)₃CNH₂, 0,1 mM EDTA).

2.15. Анализ цитотоксичности HER2-специфичных клеток

В качестве клеток-мишеней для оценки прямой цитотоксичности HER2-специфичных Т-лимфоцитов использовались опухолевые клетки линии аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 (Банк клеточных культур ИИЦ РАН, Россия).

Для использования в эксперименте линия MCF-7 была разморожена стандартным методом с отмывкой от криоконсерванта. Для культивирования MCF-7 использовалась среда EMEM, дополненная 10% FCS, 2 mM L-глутамина, 5×10^{-5} mM меркаптоэтанола, 25 mM HEPES, 80 мкг/мл гентамицина, 100 мкг/мл ампициллина, 10 мкг/мл инсулина. Перед использованием в эксперименте размороженные опухолевые клетки подвергались 4-5 пассажам в культуральных флаконах с поверхностью роста 25 см². Пассирование проводилось каждые 3-4 дня по достижении высокой плотности опухолевых клеток с образованием монослоя. Снятие клеток производилось с использованием раствора трипсина-Версена (раствор трипсина 0.25%, раствор Версена 0.02%) в соотношении 1:3).

В тесте на цитотоксичность клетки-мишени предварительно метились CFSE. Для этого опухолевые клетки снимали с пластика раствором трипсина-Версена, однократно отмывали в среде EMEM, и ресуспендировали клеточный осадок в 0,5 мл 25 mM PBS с 0,1% BSA. К полученной суспензии клеток, содержащей до 5×10^6 клеток, добавляли 2 мкМ CFSE, и инкубировали в течение 10 мин во влажной атмосфере при 37 °C, 5% CO₂.

Далее клетки отмывали дважды в 5 мл ледяной среды для культивирования, и затем подвергали совместному культивированию в 96-луночном круглодонном планшете с культурой HER2-специфичных Т-лимфоцитов в соотношении 1:10, соответственно, в концентрации 1 млн/мл, в среде для культивирования в течение 48 часов. В качестве контроля использовалась совместная культура опухолевых клеток и общей культуры МНК, а также клетки линии MCF-7, не подвергавшиеся совместному культивированию с МНК (контроль спонтанной гибели клеток-мишеней).

После 48 часов инкубации культуры клеток метились пропидий иодидом. Для этого планшет с клетками центрифугировали в течение 7 минут при 1200 об/мин, после чего супернатанты собирали в пробирки на 250 мкл и замораживали для последующего проведения иммуноферментного анализа. Осадки клеток ресуспендировали в 100 мкл PBS, добавляли 1 мкг/мл PI и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Меченные клетки

контрольных и опытных проб анализировались методом проточной цитометрии на приборе BD FACSVerse.

Схема гейтирования клеток MCF-7 состояла из выделения гейта клеток с флуоресценцией в канале FITC, что соответствует параметрам эмиссии метки CFSE (рисунок 2.4, А), и последующего выделения из данного гейта событий, фенотипически (по параметрам прямого и бокового светорассеивания) соответствующих клеткам линии MCF-7 (рисунок 2.4, Б).

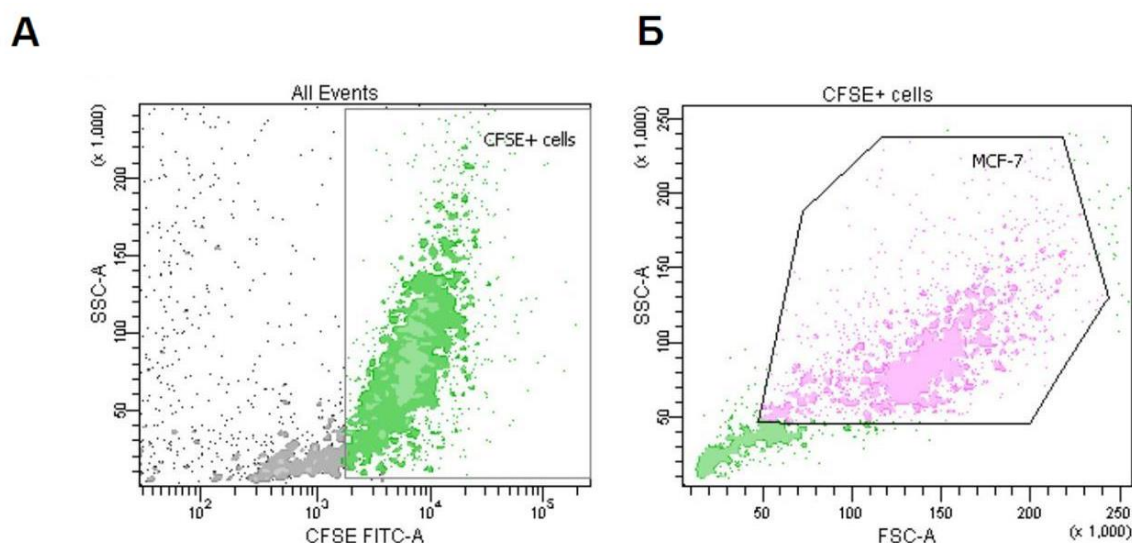


Рисунок 2.4 — Точечные диаграммы, отражающие схему гейтирования, используемую для определения гейта клеток линии MCF-7.

Анализ флуоресценции в канале фикоэритрина показывал клетки с поврежденной мембраной, окрашенные иодидом пропидия. Примеры диаграмм контрольных и опытной проб, отражающие принцип гейтирования PI-позитивных клеток MCF-7, отражен на рисунке 2.5.

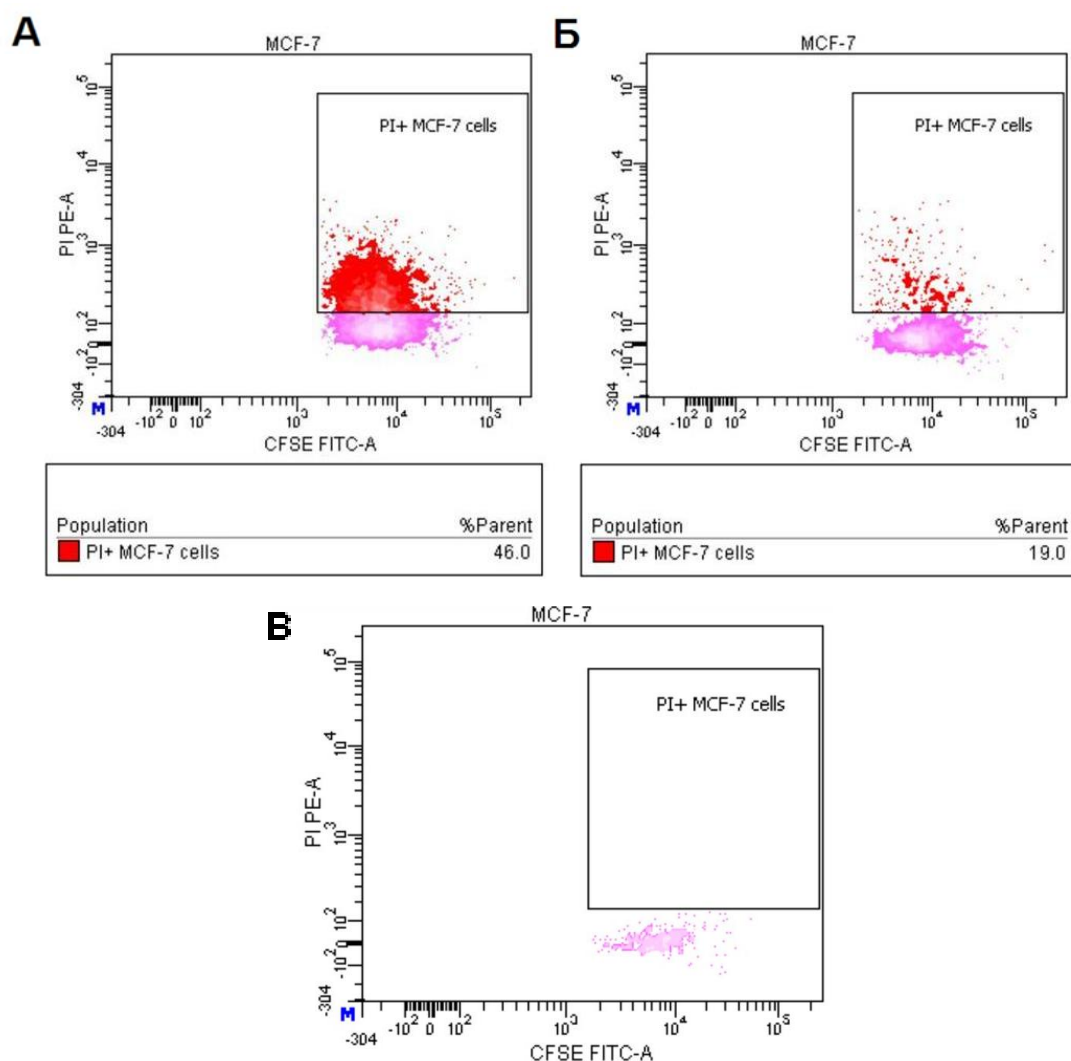


Рисунок 2.5 — Точечные диаграммы, отражающие события гейта клеток линии MCF-7.

Примечание: на всех диаграммах выделен гейт PI⁺ клеток линии MCF-7, соответствующих клеткам с поврежденной мембраной. А — Точечная диаграмма событий гейта MCF-7 опытной пробы (совместная культура клеток CFSE⁺ MCF-7 и HER2-специфичных ЦТЛ, меченная PI). Б — Точечная диаграмма событий гейта MCF-7 пробы-контроля спонтанной гибели клеток-мишеней (культура клеток CFSE⁺ MCF-7, меченная PI). В — Точечная диаграмма событий гейта MCF-7 PI-негативного контроля (культура клеток CFSE⁺ MCF-7, не меченная PI).

2.16. Определение концентрации IFN-γ в кондиционных средах

Иммуноферментный анализ для определения уровня продукции IFN-γ HER2-специфичными клетками в ответ на предъявление клеток-мишеней, несущих на

поверхности целевой антиген, был проведен с использованием готового коммерческого набора « γ -ИНТЕРФЕРОН-ELISA-БЕСТ». Кондиционные среды были собраны через 48 часов совместного культивирования E75- и E88-специфичных клеток с клетками линии MCF-7 и заморожены до температуры -20 °C. Для проведения ELISA среды были разморожены и проанализированы согласно протоколу фирмы-производителя набора.

2.17. Методы статистической обработки

Статистическая обработка данных производилась с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, США). Оценка значимости отличий между исследуемыми группами производилась с использованием непараметрических статистических критериев. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, сравнение независимых выборок с определением статистической значимости отличий проводилось с использованием критерия Манна-Уитни и непараметрического дисперсионного рангового критерия Краскела-Уоллиса с множественным сравнением медиан. Статистическая значимость изменений в зависимых выборках устанавливалась с помощью критерия Вилкоксона. Различия сравниваемых параметров считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$, уровни значимости отличий указаны в пояснениях к иллюстрациям.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Оценка содержания HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови условно-здоровых доноров и пациентов с HER2-позитивным раком молочной железы

Для сравнения особенностей репертуара HER2-специфичных цитотоксических Т-клеток у здоровых людей и больных HER2-позитивным раком молочной железы мы провели цитометрическое исследование относительного содержания CD8⁺ Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам E75 и E88 опухоль-ассоциированного антигена HER2/neu, в лимфоцитарном пуле мононуклеарных клеток периферической крови.

Мы установили, что для пациентов с HER2-позитивным РМЖ в анамнезе характерным является значимо более высокий процент HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению со здоровыми донорами, что справедливо как для E75-специфичных, так и для E88-специфичных Т-клеток (рисунок 3.1).

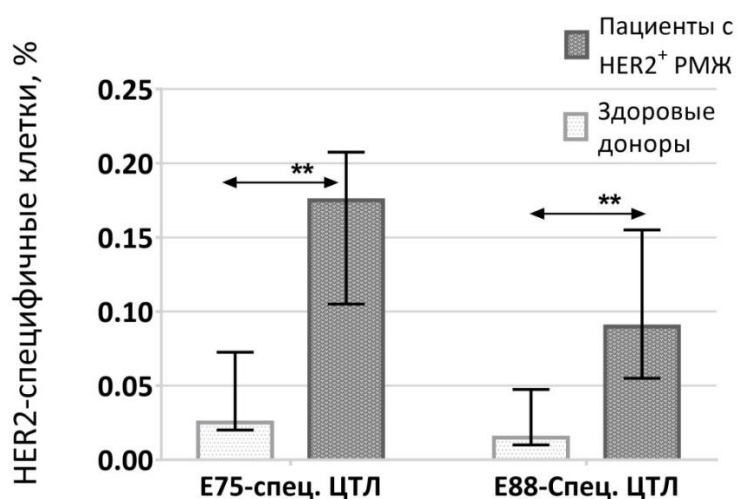


Рисунок 3.1 — Относительное содержание CD8⁺HER2⁺ лимфоцитов в МНК ПК условно-здоровых доноров (n = 8) и пациентов с HER2-позитивным раком молочной железы (n = 4). Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелками обозначены статистически значимые различия, $p \leq 0,05$ (Mann-Witney test).

Таким образом, можно утверждать, что в периферической крови здорового человека могут присутствовать CD8⁺ Т-клетки, специфичные к белку HER2, а также что у пациентов с HER2-позитивным раком молочной железы имеет место развитие специфического клеточного иммунного ответа, проявляющееся в более высоком содержании HER2-специфичных ЦТЛ в периферическом кровотоке, по сравнению с содержанием таковых в крови здоровых доноров.

3.2. Разработка протокола получения HER2-специфичных Т-лимфоцитов

3.2.1. Оптимизация метода выделения прилипающей фракции мононуклеарных клеток

Важной задачей, необходимой для достижения цели исследования, стала разработка протокола получения антиген-специфичных Т-лимфоцитов с использованием аутологичных дендритных клеток, трансфицированных плазмидой, кодирующей эпитопы белка HER2, технологии стрептамеров и магнитной сепарации, с оптимизацией всех этапов протокола.

На этапе выделения моноцитов из общей фракции МНК ПК условно-здоровых доноров, с целью увеличения эффективности данной процедуры мы провели сравнительный анализ протоколов выделения моноцитов адгезией на пластике, предполагающих использование различных временных режимов и вариантов обработки пластика. Нами рассматривалось 6 вариаций метода: прилипающую фракцию клеток получали, соответственно, посредством культивирования на пластике, обработанном BSA в течение 30, 60 и 120 минут, а также посредством культивирования на пластике без дополнительной обработки в течение 30, 60 и 120 минут.

Культуры клеток с повышенной адгезивной способностью, полученные с использованием 6 предложенных протоколов, были проанализированы на проточном цитометре для выявления культур с наибольшим содержанием клеток, несущих моноцитарный маркер CD14. Результаты исследования относительного количества CD14⁺ клеток в культурах, полученных с использованием 6 вариаций метода, представлены на рисунке 3.2.

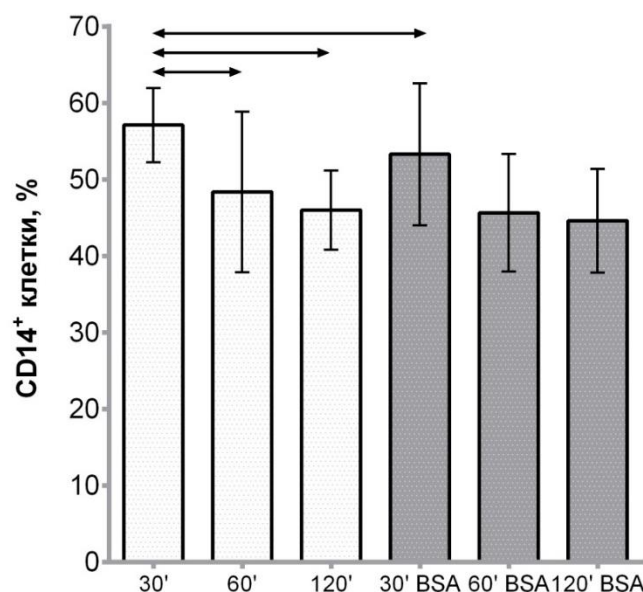


Рисунок 3.2 — Содержание CD14⁺ клеток в популяции моноцитов культур клеток МНК ПК условно-здоровых доноров после адгезии на пластике с обработкой BSA и без неё (n = 12). Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего. Стрелками обозначены статистически значимые различия, $p \leq 0,05$.

Примечание: 30' — Адгезия на пластике без обработки в течение 30 минут; 60' — адгезия на пластике без обработки в течение 60 минут; 120' — адгезия на пластике без обработки в течение 120 минут; 30' BSA — адгезия на пластике с дополнительной обработкой BSA в течение 30 минут; 60' BSA — адгезия на пластике с дополнительной обработкой BSA в течение 60 минут; 120' BSA — адгезия на пластике с дополнительной обработкой BSA в течение 120 минут.

Как видно из диаграммы, представленной на рисунке 3.2, вне зависимости от характера обработки пластика наблюдалась тенденция к увеличению количества целевых CD14⁺ клеток при использовании протоколов 30-минутной инкубации, по сравнению с более длительными протоколами. При этом наибольшее количество целевых клеток, являющееся показателем эффективности протокола выделения

моноцитов, наблюдалось в культурах клеток, полученных с использованием протокола инкубации клеток без дополнительной обработки пластика в течение 30 минут. Данный протокол был, таким образом, выбран для дальнейшего использования в исследовании.

3.2.2. Оценка эффективности доставки ДНК-конструкции в дендритные клетки методами магнитной трансфекции и нуклеофекции

Для определения оптимального способа доставки ДНК-конструкции, кодирующей эпитопы антиген-ассоциированного антигена, в дендритные клетки, был проведен эксперимент по сравнению методов магнитной трансфекции и нуклеофекции дендритных клеток условно-здоровых доноров. В качестве ДНК-конструкции для обоих видов трансфекции использовали плазмиду pMaxGFP, аналогичную опытной плазмиде HER2 (pMax2epitope), кодирующую флуоресцентный белок GFP, с последующим анализом относительного количества клеток, экспрессирующих белок GFP, на проточном цитометре.

При сравнении результатов цитометрического исследования трансфицированных дендритных клеток от 6 условно-здоровых доноров было установлено, что относительное содержание дендритных клеток, экспрессирующих GFP на своей поверхности, в образцах клеток, трансфицированных методом нуклеофекции, значительно превышает таковое в образцах, трансфицированных методом магнитной трансфекции (41,75% GFP⁺ клеток против 31,50%, соответственно), как видно из рисунка 3.3.

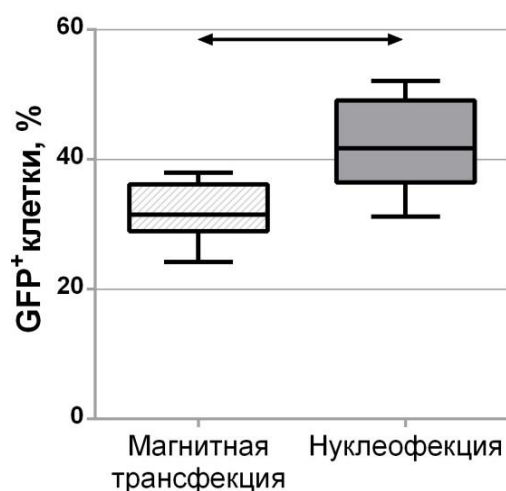


Рисунок 3.3 — Относительное содержание клеток, экспрессирующих GFP ($n = 6$). Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелкой обозначено статистически значимое различие, $p < 0,05$.

Таким образом, для доставки ДНК-конструкций в дендритные клетки был выбран метод нуклеофекции ДК как наиболее эффективный из методов антигенной нагрузки ДК, рассматриваемых в настоящем исследовании.

3.2.3. Оценка фенотипа и функциональной активности полученных дендритных клеток

Для получения незрелых дендритных клеток моноциты прилипающей фракции периферической крови условно-здоровых доноров культивировались по протоколу с добавлением GM-CSF (50 нг/мл) и IL-4 (100 нг/мл) в течение 96 часов. Затем незрелые дендритные клетки подвергались процедуре нуклеофекции, после чего трансфицированные ДК культивировались в присутствии созревающего стимула TNF- α (25 нг/мл) в течение 18 часов.

Для оценки эффективности протокола получения дендритных клеток из прилипающей фракции МНК проводилась оценка фенотипа полученных клеток на стадиях прилипающих МНК, незрелых и зрелых ДК с помощью специфических

антител к поверхностным маркерам, описанным в литературе как маркеры дендритных клеток [Obermaier et al., 2003; Tanaka et al., 2006; Jarnjak-Jankovic et al., 2007]. Результаты эксперимента представлены на рисунке 3.4.

При сравнении показателей исследуемых выборок было показано статистически значимое снижение относительного количества клеток, экспрессирующих маркер CD14, в популяциях нДК и зДК по сравнению с МНК прилипающей фракции. Показано значимое повышение содержания клеток, экспрессирующих маркеры CD86, HLA-DR, CD11c, в культуре зрелых дендритных клеток по сравнению с прилипающей фракцией МНК, а также значимое повышение содержания клеток, дубль-позитивных по экспрессии маркеров HLA-DR и CD11c. Описанные изменения фенотипа в ряду «прилипшие МНК — незрелые ДК — зрелые ДК» свидетельствуют о дифференцировке моноцитов прилипающей фракции в дендритные клетки под действием цитокинов, последовательном приобретении более зрелого фенотипа дендритными клетками, усилении антиген-презентирующей функции.

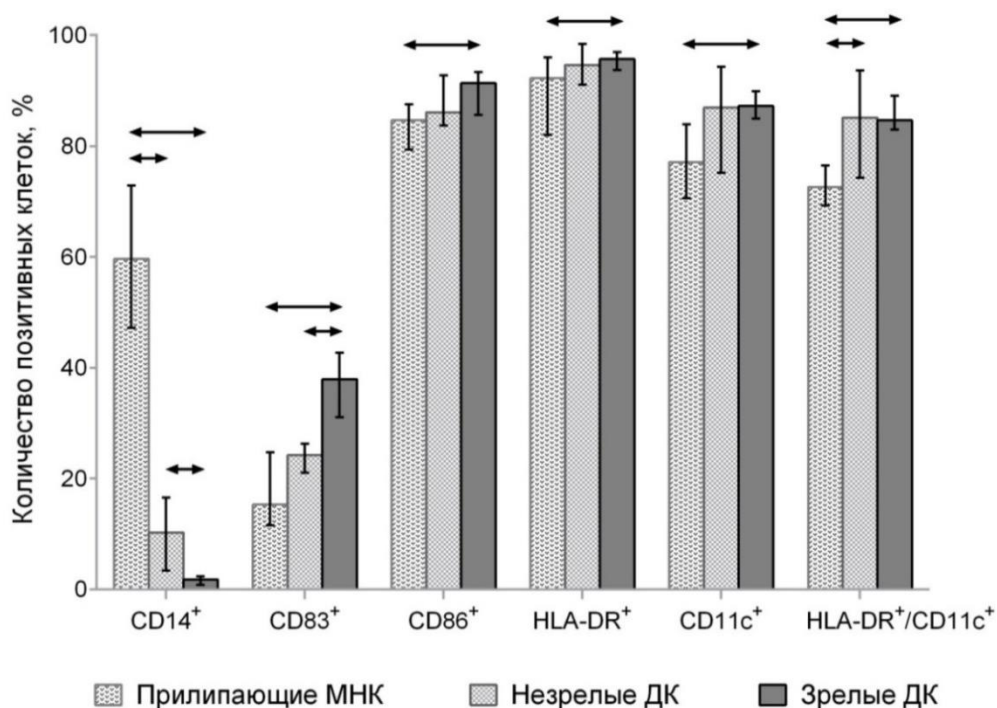


Рисунок 3.4 — Относительное количество клеток, экспрессирующих маркеры дендритных клеток и маркер CD14 ($n = 12$). Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелками обозначены статистически значимые различия, $p \leq 0,05$.

Статистически значимое увеличение относительного количества CD83⁺ клеток в популяции зрелых ДК по сравнению с незрелыми ДК и клетками прилипающей фракции также указывает на дифференцировку и созревание дендритных клеток в ходе культивирования по используемым протоколам. CD83 представляет собой иммуноглобулиноподобную молекулу — специфический маркер терминальной дифференцировки дендритных клеток с неустановленной функцией. Показано, что увеличение экспрессии CD83 происходит при культивировании ДК *in vitro* [Li et al., 2012]. Селективная экспрессия и увеличение уровня экспрессии наряду с такими костимуляторными молекулами, как CD80 и CD86, предполагают важную роль CD83 в иммунном ответе.

Оценка способности генерированных ДК захватывать антиген проводилась посредством анализа уровня рецептор-опосредованного эндоцитоза в тесте на захват клетками FITC-декстрана при +4 °C и при +37 °C. Степень захвата FITC-декстрана ДК определялась по формуле:

$$\text{Индекс эндоцитозной активности} = (\text{MFI } 37^\circ\text{C} / \text{MFI } 4^\circ\text{C}) \times 100\%,$$

где **MFI 37°C** — средняя интенсивность флуоресценции меченых клеток при +37 °C (специфическая эндоцитозная активность), а **MFI 4°C** — средняя интенсивность флуоресценции меченых клеток при +4 °C (неспецифическая активность).

Установлено, что клетки фракции зрелых ДК обладают значимо меньшей активностью в захвате антигена, чем клетки фракции незрелых ДК (рисунок 3.5), что подтверждает созревание дендритных клеток, поскольку только незрелые ДК способны к эффективному захвату антигена по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза.

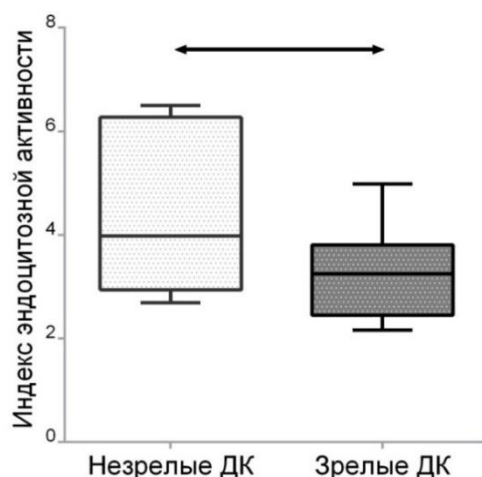


Рисунок 3.5 — Эндоцитозная активность ДК в зависимости от степени их зрелости ($n = 12$). Исследуемые ДК получены из моноцитов периферической крови здоровых доноров. Данные представлены в виде медианы, межквартильного интервала, минимума и максимума значений. Стрелкой обозначено статистически значимое различие, $p < 0,05$.

Таким образом, нами было показано, что в ходе использования протоколов получения незрелых и зрелых ДК под действием цитокинов моноциты условно-здоровых доноров дифференцируются в зрелые дендритные клетки.

Для активации HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов нагруженные антигеном зДК подвергались совместному культивированию с аутологичными МНК в соотношении МНК : ДК = 10 : 1 в течение 5 суток, после чего производилась оценка относительного содержания и фенотипа HER2-специфичных ЦТЛ в совместной культуре МНК и ДК, а также магнитная сортировка эпитоп-специфичных ЦТЛ из совместной культуры МНК и ДК с последующей наработкой количества отсортированных HER2-специфичных клеток для исследования их цитотоксической активности.

3.2.4. Оценка содержания HER2-специфичных Т-лимфоцитов в совместной культуре моноклеарных клеток и нагруженных антигеном дендритных клеток

Для оценки эффективности активации HER2-специфичных Т-лимфоцитов дендритными клетками, трансфицированными плазмидой HER2, мы проанализировали содержание цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам E75 и E88 HER2/неу, в совместной культуре МНК и трансфицированных ДК.

Протокол окраски HER2-специфичных Т-лимфоцитов был оптимизирован для окрашивания пробы, содержащей 1×10^6 клеток. По результатам титрования концентрации МНС и подбора оптимального соотношения реагентов окрашивающего комплекса было выбрано следующее соотношение: 1 мкл Strep-Tactin-PE и 0,8 мкл МНС в конечном объёме 25 мкл буферного раствора IS buffer. Цитометрический анализ окрашенных клеток показал, что в культуре МНК без совместного культивирования с ДК, нагруженными антигеном, относительное количество HER2-специфичных лимфоцитов не превышало значений фоновой флуоресценции. Анализ совместной культуры МНК и дендритных клеток, трансфицированных плазмидой HER2 (МНК+ДК_{HER2}), показал, что используемый протокол позволяет получить культуру МНК с содержанием Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопу E75, до 0,69%, и E88-специфичных Т-лимфоцитов до 0,82%, соответственно. При этом установлено, что содержание HER2-специфичных лимфоцитов в культурах МНК+ДК_{HER2} значительно превышает таковое в контрольных пробах, представляющих собой совместные культуры МНК и ДК, трансфицированных контрольной плазмидой p5 (МНК+ДК_{p5}), как видно из диаграмм, представленных на рисунке 3.6.

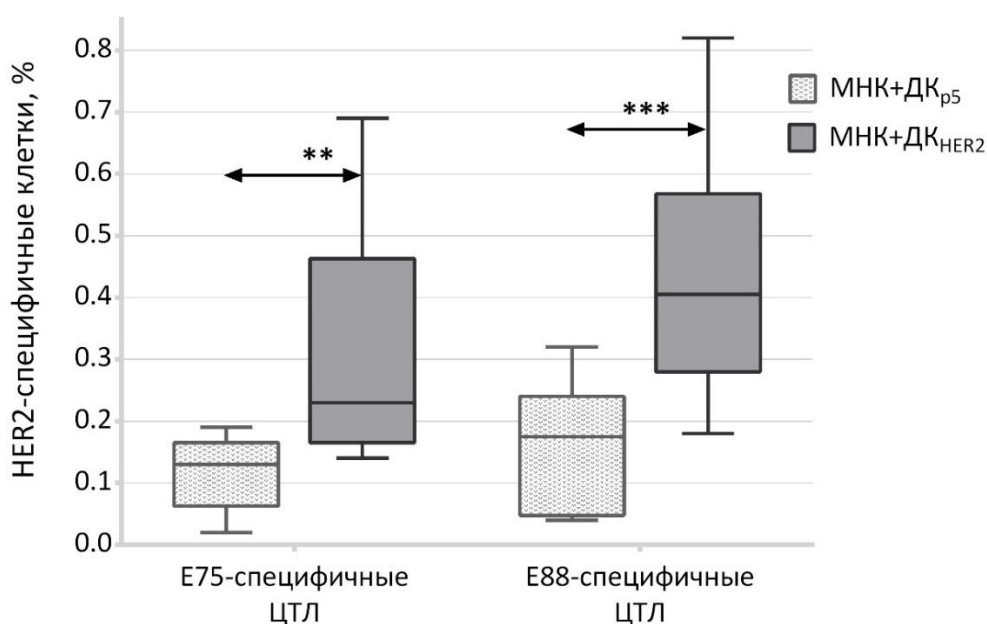


Рисунок 3.6 — Относительное содержание HER2-специфичных лимфоцитов в совместных культурах МНК и ДК ($n = 12$). Данные представлены в виде медианы, межквартильного интервала, минимума и максимума. Стрелками обозначены статистически значимые различия, ** — $p < 0.01$, *** — $p < 0.001$ (Repeated measures two-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test).

Примечание: МНК+ДК_{p5} — клетки совместной культуры МНК и ДК, трансфицированных контрольной плазмидой p5; МНК+ДК_{HER2} — клетки совместной культуры МНК и ДК, трансфицированных плазмидой, кодирующей эпитопы E75 и E88 антигена HER2/neu.

Таким образом, приведенные на рисунке 3.6. результаты подтверждают, что увеличение содержания HER2-специфичных Т-лимфоцитов в опытных пробах связано непосредственно с активацией лимфоцитов дендритными клетками, трансфицированными плазмидой HER2, и не связана с неспецифической активацией Т-клеток дендритными клетками, трансфицированными контрольной плазмидой, или с неспецифической активацией любыми другими типами антиген-презентирующих клеток, которые могли присутствовать в исследуемых культурах.

Кроме того, сравнение содержания HER2-специфичных клеток в культуре МНК, сокультивированных с ДК, трансфицированными плазмидой HER2, с таковым в первично-выделенной культуре не активированных *in vitro* МНК ПК условно здоровых доноров, показало, что разработанный протокол активации

позволяет повысить содержание E75-специфичных Т-лимфоцитов в среднем в 8 раз, содержание E88-специфичных Т-лимфоцитов — в среднем в 22 раза (согласно сравнению средних значений выборок, 0,32% против 0,04% для E75-специфичных клеток, 0,44% против 0,02%, соответственно).

3.2.5. Получение популяций цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам E75 и E88 антигена HER2/neu

Чистые популяции HER2-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов получали из совместных культур МНК+ДК_{HER2} путем выделения клеток, специфичных к эпитопам E75 и E88 антигена HER2/neu, методом магнитной сортировки по технологии Streptamer на колонках MS Columns. Протокол магнитной сортировки компании-производителя ИВА был оптимизирован для выделения антиген-специфичных Т-клеток из совместной культуры МНК и ДК, состоящей из $0,5-1 \times 10^7$ клеток. Количество клеток в отсортированной фракции антиген-специфичных лимфоцитов составляло в среднем $0,5-1 \times 10^4$ клеток. Индукция пролиферации цитокинами IL-2, IL-7 и IL-15 позволила увеличить количество антиген-специфичных клеток примерно в 5-10 раз, до $0,5-1 \times 10^5$ клеток.

Эффективность проводимой процедуры магнитной сортировки процедуры была оценена с помощью анализа содержания CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов в культурах отсортированных клеток, поскольку оценить эффективность магнитной сортировки прямым способом — с помощью окрашивания по технологии Streptamer, — не представлялось возможным, так как процедура окрашивания по данной технологии требует использования большого количества клеток. Анализ клеток от 8 доноров показал содержание CD8⁺ клеток, составляющее в среднем 71,5% в культуре E88-специфичных Т-лимфоцитов и 90,2% в культуре E75-специфичных Т-лимфоцитов, соответственно. На

рисунке 3.7 представлены типичные результаты цитометрического анализа контрольной и опытной проб.

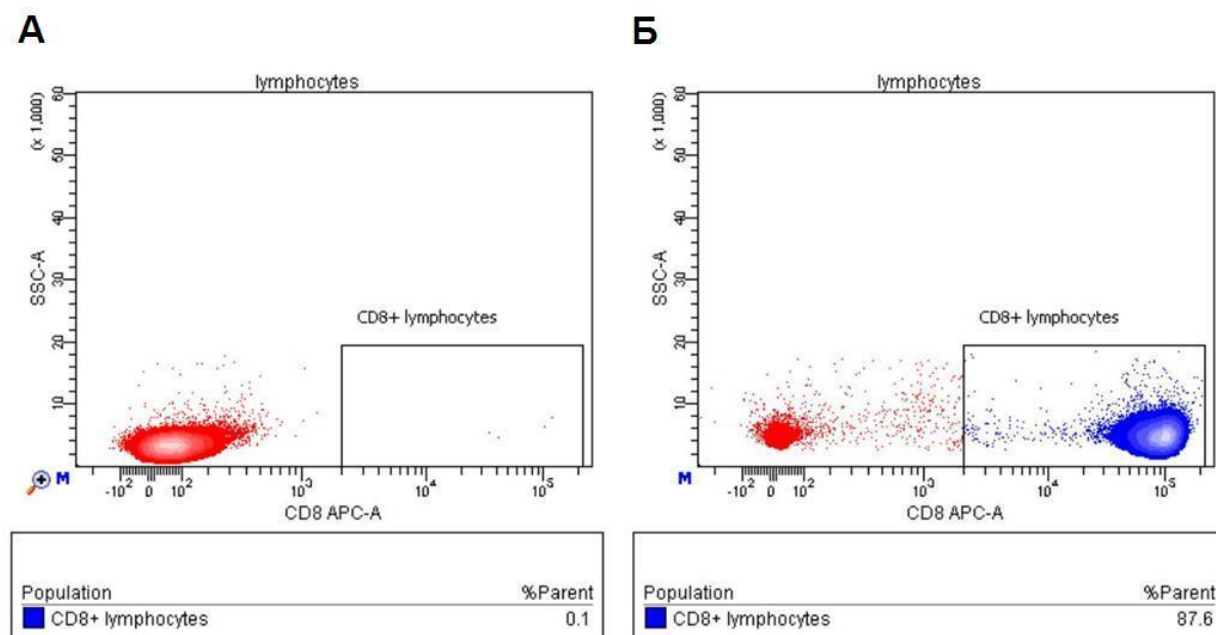


Рисунок 3.7 — Оценка относительного содержания CD8⁺ клеток в 14-дневной культуре HER2-специфичных Т-лимфоцитов, выделенных методом магнитной сортировки.

Примечание: А — точечная диаграмма распределения событий лимфоцитарного гейта контрольной пробы (не меченные клетки); Б — точечная диаграмма распределения событий лимфоцитарного гейта опытной пробы (14-дневная культура клеток, отсортированных по эпитопу E88, меченных антителами anti-CD8-APC).

Таким образом, о высокой чистоте популяций HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов, полученных с помощью магнитной сепарации, можно судить по высокому содержанию лимфоцитов, несущих на своей поверхности маркер CD8. В пользу чистоты полученной популяции также говорит тот факт, что в опытной пробе антиген-специфичных клеток не обнаруживались клетки моноцитарного пула (по показателям прямого и бокового светорассеивания), а также клетки иной морфологии, кроме клеток лимфоцитарного пула. Кроме того, сама процедура магнитной сортировки по технологии Streptamer основана на взаимодействии магнитных бус, конъюгированных с молекулами МНС I класса, несущими целевые антигенные эпитопы, с антиген-специфичными Т-клеточными рецепторами Т-лимфоцитов.

Приведенные данные, таким образом, позволяют утверждать, что выделенная популяция действительно представляет собой CD8⁺ HER2-специфичные Т-лимфоциты.

3.2.6. Обогащение культуры отсортированных HER2-специфичных Т-лимфоцитов

Для подбора оптимальных условий для обогащения культуры отсортированных Т-лимфоцитов был проведен эксперимент по титрованию концентраций цитокинов rhIL-2, rhIL-7 и rhIL-15 в различных комбинациях, поскольку именно эти цитокины по данным научной литературы являются наиболее важными стимуляторными факторами для пролиферации и поддержания жизнеспособности CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов и CD8⁺ Т-клеток памяти. Определение наиболее подходящих комбинации и концентраций стимуляторных молекул осуществлялось посредством оценки пролиферативной активности CD8⁺ клеток в общей культуре МНК периферической крови условно-здоровых доноров.

В результате проведенного эксперимента была выбрана комбинация из всех трех исследуемых цитокинов, где концентрация каждого стимулятора составила 50 нг/мл (рисунок 3.8). Пролиферативная активность CD8⁺ Т-клеток оценивалась с помощью красителя CFSE по относительному количеству клеток, совершивших одно или несколько делений.

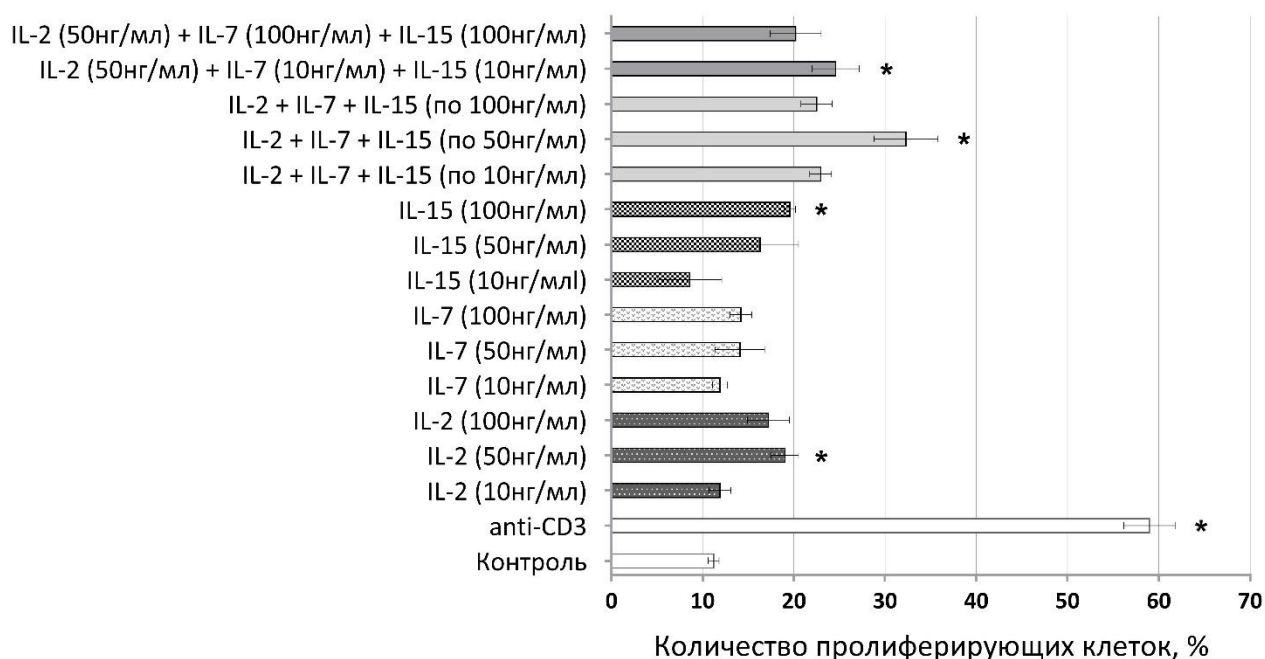


Рисунок 3.8 — Пролиферация $CD8^+$ лимфоцитов условно-здоровых доноров в присутствии различных стимуляторов ($n = 6$). Данные представлены в виде среднего и ошибки среднего.

Примечание: * — статистически значимые различия по сравнению с группой контроля, $p \leq 0.05$. Контроль — культура $CD8^+$ клеток без стимуляции. Anti-CD3 (4 мкг/мл) — позитивный контроль пролиферации.

3.2.7. Подбор клеток-мишеней для анализа специфического противоопухолевого клеточного иммунного ответа

Для анализа цитотоксичности *in vitro*-генерируемых популяций HER2-специфичных клеток необходимо было подобрать опухолевую клеточную линию человека, экспрессирующую антиген HER2/neu и несущую аллель HLA A*02. Поскольку наиболее распространенной локализацией опухоли, чрезмерно экспрессирующей HER2 на поверхности клеток, является молочная железа, мы ограничили свой выбор линиями, происходящими от опухолей данной локализации. В Российской коллекции клеточных культур позвоночных (РККП)

было обнаружено три линии-кандидата, описание которых представлено в таблице 3.1.

Таблица 3.1 — Клеточные линии опухолей молочной железы человека Российской коллекции клеточных культур позвоночных, характеризующиеся экспрессией белка HER2/neu.

№ п/п	Название опухолевой линии	Происхождение	Статус экспрессии HER2
1	BT-474	карцинома протока молочной железы	3+
2	ZR-75/1	протоковая карцинома молочной железы, асцит	2+
3	MCF-7	аденокарцинома молочной железы	0-1+

По результатам генотипирования клеточных линий-кандидатов на роль опухолевых клеток-мишеней была выбрана линия MCF-7, поскольку данная линия оказалась HLA A*0201⁺, тогда как BT-474 и ZR-75/1 оказались негативными по экспрессии HLA A*02.

Поскольку в научной литературе линия MCF-7 описана как слабо экспрессирующая антиген HER2/neu, нам было важно проверить наличие экспрессии гена *ErbB2*, кодирующего данный белок, в клетках исследуемой линии.

Наличие экспрессии *ErbB2* в клетках линии MCF-7 было подтверждено с использованием реакции ОТ-ПЦР в режиме реального времени и электрофореза в 1,5% агарозном геле.

На рисунке 3.9. представлены результаты ОТ ПЦР в виде кривой амплификации и кривой плавления для гена *ErbB2* (рисунок 3.9 А, Б) а также фореграмма, отражающая результаты агарозного гель-электрофореза (рисунок 3.9 В).

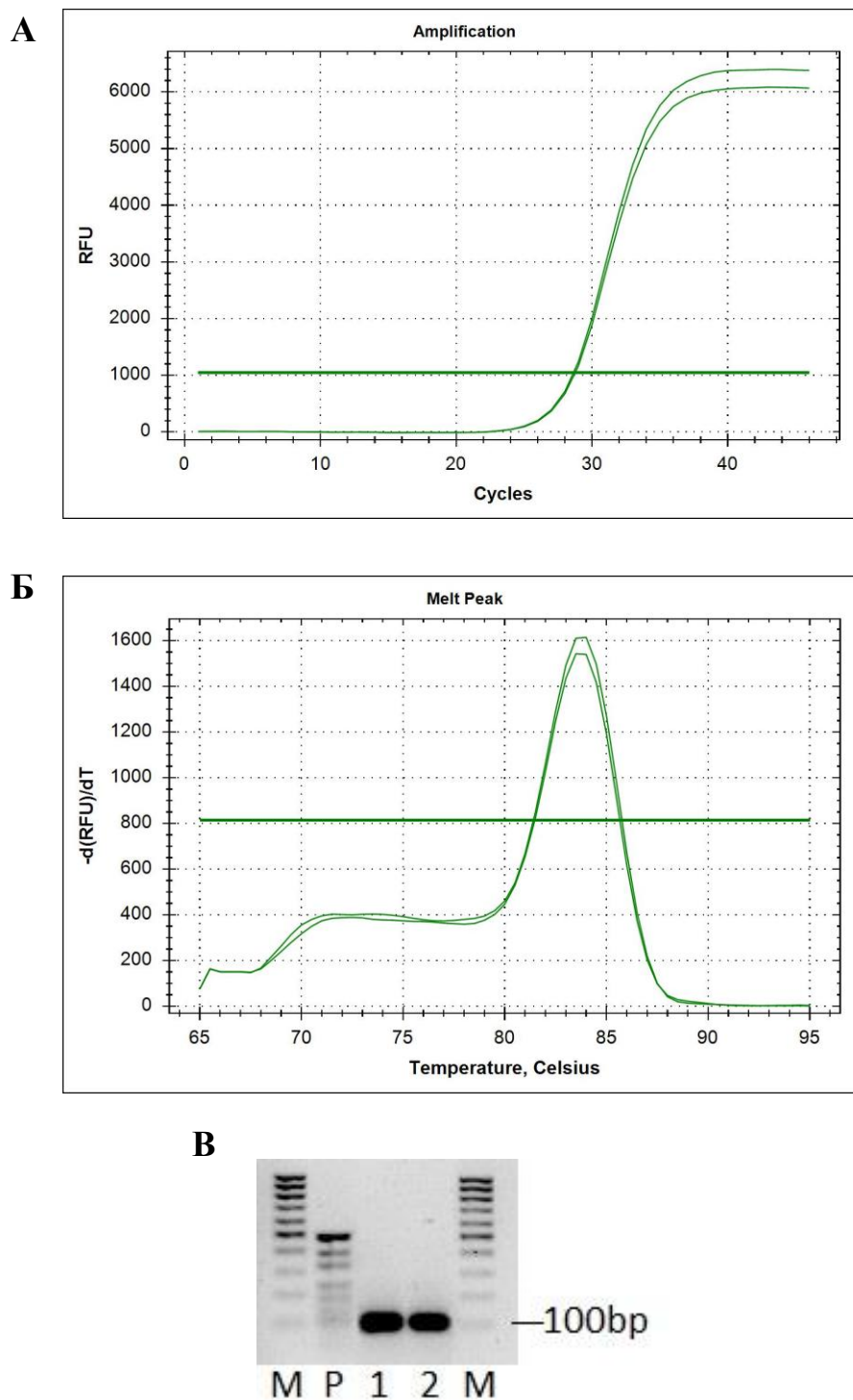


Рисунок 3.9 — Результаты оценки экспрессии гена *ErbB2* в клетках опухолевой линии MCF-7. А, Б — Кривые амплификации и плавления продукта амплификации в реакции ОТ-ПЦР. Представлен результат для образца, полученного из клеток MCF-7 одного пассажа, в дублях. В — Электрофореграмма продуктов амплификации гена *ErbB2*.

Примечание: P — ДНК-маркер pUC19/Msp I, М — ДНК-маркер 100bp (10 фрагментов от 100 до 1000 bp); 1-2 — продукты амплификации гена *ErbB2*, полученные методом ОТ-ПЦР из РНК клеток MCF-7 двух разных пассажей; Полосы на 1 и 2 дорожках геля указывают на наличие продукта амплификации в обоих образцах, длина которого составляет порядка 100 bp.

Прибор для ОТ ПЦР измерял уровень флюоресценции в образцах на каждый градус, начиная с 65°C и до 95°C, и автоматически определял количество пиков и соответствующую им температуру плавления ампликонов.

Анализ кривых амплификации и плавления (правильная сигмовидная форма кривой амплификации с фазой экспоненциального роста и выходом на плато на рисунке 3.9, А; единственный, хорошо выраженный пик плавления при температуре 84 °C на рисунке 3.9, Б), а также электрофорез продукта на агарозном геле (только один продукт амплификации для каждого из образцов от MCF-7 двух разных пассажей с ожидаемым размером; дорожки 1 и 2 на рисунке 3.9, В) указывают на то, что в реакции присутствует только один продукт, представляющий собой продукт амплификации *ErbB2*.

Таким образом, приведенные результаты свидетельствуют о наличии экспрессии гена *ErbB2*, кодирующего белок HER2/neu, в клетках линии MCF-7. Данный факт в совокупности с положительным результатом анализа наличия аллели HLA A*02 у клеток данной линии стал основанием к выбору клеток MCF-7 в качестве клеток-мишеней для оценки цитотоксичности HER2-специфичных HLA-A*02⁺ ЦТЛ.

3.3. Цитотоксические свойства HER2-специфичных Т-лимфоцитов

3.3.1. Анализ цитотоксичности HER2-специфичных Т-лимфоцитов против клеток линии MCF-7

Эксперименты по оценке эффективности цитотоксического ответа полученной культуры против клеток-мишеней, несущих на своей поверхности целевые антигены, проводили после культивирования отсортированных клеток в присутствии стимуляторов rhIL-2, rhIL-7 и rhIL-15 в течение 10-14 дней.

Цитотоксическая активность Т-лимфоцитов оценивалась после совместного культивирования антиген-специфичных клеток и клеток-мишеней методом проточной цитометрии, по проценту PI-позитивных опухолевых клеток (клеток MCF-7 с поврежденной мембраной) в пробах.

Для подсчета процента цитотоксичности использовали следующую формулу:

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \% \text{ PI+CFSE+ MCF-7}_{(\text{effector+target})} - \% \text{ PI+CFSE+ MCF-7}_{(\text{target})},$$

где $\% \text{ PI+CFSE+ MCF-7}_{(\text{effector+target})}$ — процент поврежденных клеток линии MCF-7 от общего числа клеток данной линии в пробе совместной культуры клеток-эффекторов и клеток-мишеней, $\% \text{ PI+CFSE+ MCF-7}_{(\text{target})}$ — процент спонтанной гибели клеток-мишеней.

Относительное количество поврежденных опухолевых клеток в опытных пробах, состоящих из HER2-специфичных Т-лимфоцитов и клеток линии MCF-7, в среднем составило 60,2% для E88-специфичных Т-лимфоцитов и 65,7% для E75-специфичных Т-лимфоцитов. С учетом средних значений спонтанной гибели клеток-мишеней по приведенной выше формуле были получены значения собственной цитотоксичности культур эпитоп-специфичных ЦТЛ, представленные на рисунке 3.10. значимо превысило значения собственной цитотоксичности контрольных культур МНК+ДК (5,78%) и CD8⁺ Т-клеток (7,25%), как видно из диаграмм на рисунке 3.10.

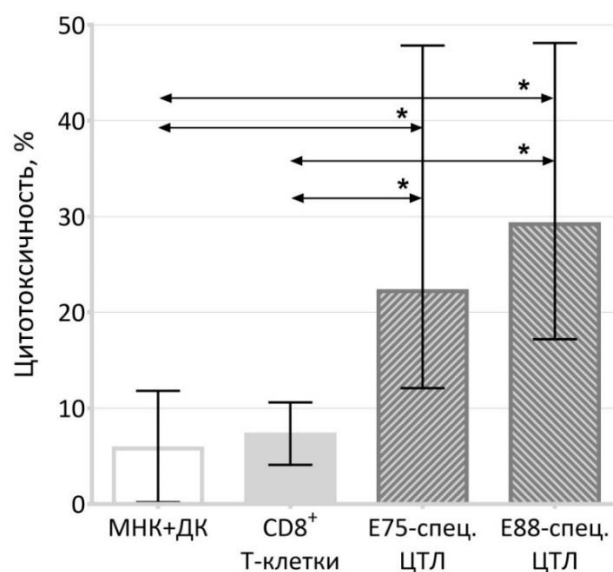


Рисунок 3.10 — Цитотоксичность культуры HER2-специфичных Т-лимфоцитов против клеточной линии MCF-7 ($n = 12$). Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелками обозначены статистически значимые различия, $p < 0.05$.

Примечание: **МНК+ДК** — цитотоксичность смешанной культуры активированных моноклеарных клеток, представляющей собой негативную фракцию клеток после сортировки E75- и E88-специфичных ЦТЛ из МНК+ДК_{HER2}. **CD8⁺ Т-клетки** — цитотоксичность культуры CD8⁺ клеток, отсортированных из МНК+ДК. **E75-спец. ЦТЛ** — цитотоксичность культуры клеток, отсортированных из МНК+ДК_{HER2} по специфичности к эпитопу E75. **E88-спец. ЦТЛ** — цитотоксичность культуры клеток, отсортированных из МНК+ДК_{HER2} по специфичности к эпитопу E88.

Таким образом, согласно полученным данным цитотоксичность культур HER2-специфичных клеток значимо превысила значения цитотоксичности контрольных культур: культуры активированных моноклеаров и дендритных клеток, не содержащие клонов E75- и E88-специфичных клеток (Рисунок 3.10, МНК+ДК), а также общей культуры CD8⁺ Т-клеток всех возможных специфичностей, имеющих в исследуемых культурах, за исключением E75- и E88-специфичных CD8⁺ Т-клеток (Рисунок 3.10, CD8⁺ Т-клетки).

Можно утверждать, что гибель клеток линии MCF-7 опосредована именно цитотоксическим действием Т-лимфоцитов, поскольку исследуемые пробы содержали в себе только клетки опухолевой линии и фракцию антиген-

специфичных Т-клеток, что, с учетом поставленных контролей на спонтанную гибель клеток-мишеней, исключает возможность влияния других факторов на гибель опухолевых клеток.

3.3.2. Анализ продукции IFN- γ

Для проверки одного из возможных механизмов цитотоксичности мы оценили продукцию IFN- γ клетками-эффекторами в ответ на предъявление опухолевых клеток-мишеней, несущих антиген HER2.

Иммуноферментный анализ концентрации IFN- γ был проведен в кондиционных средах от двухдневных культур клеток-эффекторов в присутствии клеток опухолевой линии MCF-7 и без них. Сравнение результатов анализа представлено на рисунке 3.11.

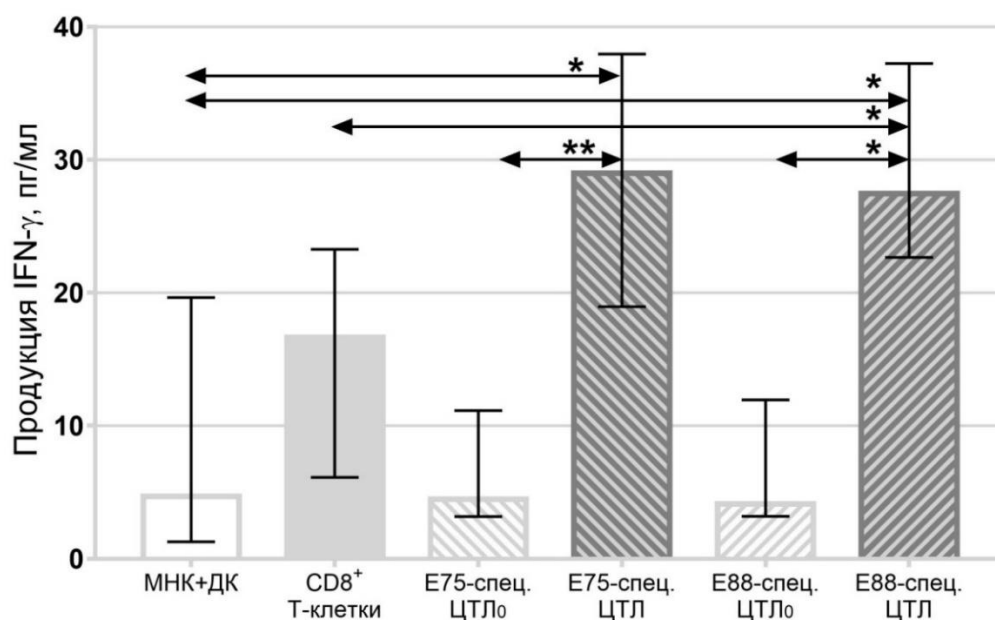


Рисунок 3.11 — Содержание IFN- γ в кондиционных средах культур мононуклеарных клеток после 48 часов совместного культивирования с MCF-7 (n = 6). Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Стрелками обозначены статистически значимые различия, * — p < 0,05, ** — p < 0,01.

Примечание: E75-спец. ЦТЛ₀ — кондиционные среды от культур E75-специфичных ЦТЛ без культивирования с MCF-7. E88-спец. ЦТЛ₀ — кондиционные среды от культур E88-специфичных ЦТЛ без культивирования с MCF-7. МНК+ДК — кондиционные среды от совместных культур МНК+ДК_{HER2}, обедненных по популяциям E75- и E88-специфичных ЦТЛ, после 48 часов культивирования с MCF-7. CD8⁺ Т-клетки — кондиционные среды от культур CD8⁺ Т лимфоцитов, отсортированных из МНК+ДК, после 48 часов культивирования с MCF-7. E75-спец. ЦТЛ — кондиционные среды от культур E75-специфичных ЦТЛ после 48 часов культивирования с MCF-7. E88-спец. ЦТЛ — кондиционные среды от культур E88-специфичных ЦТЛ после 48 часов культивирования с MCF-7.

Таким образом, было установлено, что после 48 часов совместного культивирования с клетками-мишенями содержание IFN- γ в кондиционных средах E75- и E88-специфичных ЦТЛ значительно превышает значения концентраций IFN- γ в средах от культивирования культур МНК+ДК_{HER2}, обедненных по популяциям E75- и E88-специфичных ЦТЛ, а также в средах от культивирования CD8⁺ Т лимфоцитов, отсортированных из культуры МНК + ДК_{HER2}, обедненной по популяциям E75- и E88-специфичных ЦТЛ.

3.4. Фенотипирование цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам HER2/neu

В результате исследования фенотипа совместных культур МНК и ДК от 6 условно-здоровых доноров CD8⁺ Т-клетки, активированные антиген-нагруженными ДК, а также популяции активированных E75- и E88-специфичных ЦТЛ были проанализированы по фенотипу и разделены на основные субпопуляции, выделяемые исследователями в пуле циркулирующих эффекторных CD8⁺ Т-клеток: наивные Т-лимфоциты (T_N), Т-клетки памяти со свойствами стволовых клеток (T_{SCM}), Т-клетки центральной памяти (T_{CM}), Т-клетки эффекторной памяти (T_{EM}) и терминально-дифференцированные цитотоксические

Т-лимфоциты (T_{EMRA}) [Takata et al., 2012; Mahnke et al., 2013; Кудрявцев, 2014; Samji, Khanna, 2017].

В результате анализа схем цитометрического определения перечисленных субпопуляций Т-клеток, предложенных в научной литературе, для разделения клеток на популяции была подобрана панель антител, описанная в таблице 3.2.

Таблица 3.2 — Панель цитометрических моноклональных антител и маркерам человека и реагентов, подобранная для цитометрического определения субпопуляционного состава HER2-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов.

№ п.п.	Антитело / реагент	Флуорохром, конъюгированный с антителом/реагентом	Длина волны возбуждения, нм / лазер	Эмиссия, нм
1	Anti-CD8	Brilliant-Violet-510	405 / фиолетовый	510
2	Anti-CD45RA	Pacific-Blue	405 / фиолетовый	452
3	Anti-CD62L	APC-Cy7	640 / красный	785
4	Anti-CD127-	APC	640 / красный	660
5	Anti-CD95-	PE-Cy7	488 / синий	785
6	Anti-CD28-	FITC	488 / синий	519
7	Anti-CD27-	PerCP	488 / синий	678
8	Молекулы Streptamer	PE	488 / синий	578

Схема гейтирования перечисленных субпопуляций Т-клеток памяти и цитотоксических Т-лимфоцитов, подобранная экспериментально с учетом представленных в научной литературе вариантов гейтирования аналогичных популяций, представлена на рисунке 3.12.

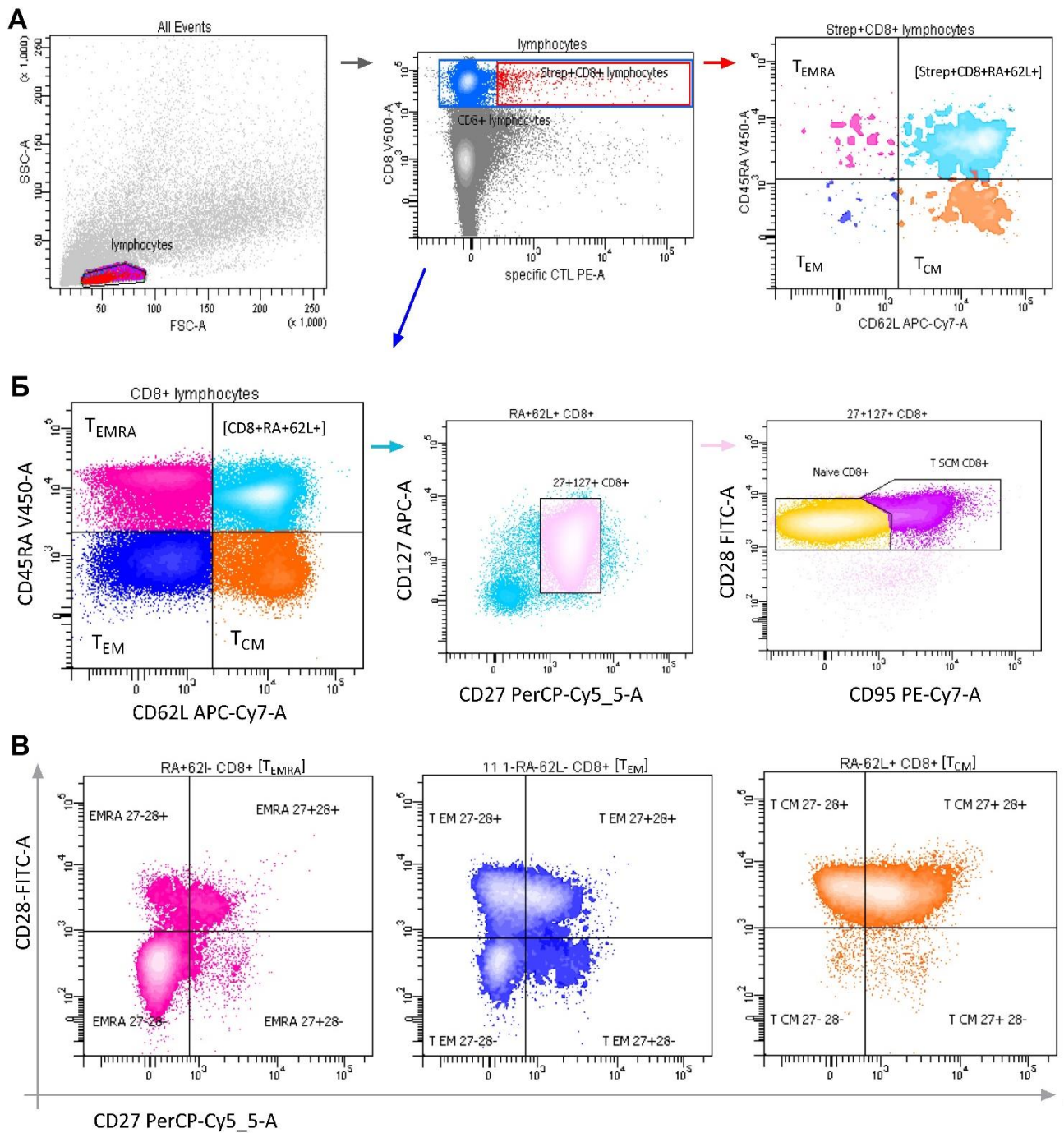


Рисунок 3.12 — Схема гейтирования, разработанная для определения субпопуляций Т-клеток памяти среди $CD8^+$ Т-лимфоцитов и среди HER2-специфичных (Streptamer⁺) $CD8^+$ Т-лимфоцитов, представленная на примере гейтирования популяции $CD8^+$ Т-лимфоцитов.

А. Из всех событий пробы по показателям прямого и бокового светорассеяния выделяли гейт лимфоцитов. Затем из событий лимфоцитарного гейта выделяли гейт $CD8^+$ клеток, а также гейт $CD8^+Streptamer^+$ клеток.

Б. События гейта $CD8^+/Streptamer^+CD8^+$ лимфоцитов разбивали на 4 гейта по экспрессии $CD45RA-V450$ и $CD62L-APC-Cy7$, таким образом получая субпопуляции T_{EMRA} ($45RA^+62L^-$),

T_{EM} ($45RA^{-}62L^{-}$) и T_{CM} ($62L^{+}45RA^{-}$) и $62L^{+}45RA^{+}$ cells. Далее из событий гейта $62L^{+}45RA^{+}$ выбирали события гейта $CD127^{+}CD27^{+}$ (получая, таким образом, популяцию $CD62L^{+}CD45RA^{+}CD127^{+}CD27^{+}$) и из них по экспрессии маркёров $CD95$ -PE-Cy-7 и $CD28$ -FITC выделяли гейты **Naive T cells** ($62L^{+}45RA^{+}27^{+}28^{+}95^{-}$) и **T_{SCM} cells** ($62L^{+}RA^{+}27^{+}28^{+}95^{+}$).

В. Из событий гейтов T_{EMRA} ($45RA^{+}62L^{-}$), T_{EM} ($45RA^{-}62L^{-}$) и T_{CM} ($62L^{+}45RA^{-}$), по флуоресценции в каналах $CD27$ -PerCP-Cy5,5 и $CD28$ -FITC анализировали профиль экспрессии маркеров $CD27$ и $CD28$.

Таким образом, с использованием подобранной панели антител и схемы гейтирования в популяциях $CD8^{+}$ Т-лимфоцитов и $Streptamer^{+}CD8^{+}$ Т-лимфоцитов искомые субпопуляции были выделены по следующим сочетаниям маркеров:

- T_{EMRA} : $CD45RA^{+}CD62L^{-}$,
- T_{EM} : $CD45RA^{-}CD62L^{-}$,
- T_{CM} : $CD45RA^{-}CD62L^{+}$,
- T_N : $CD45RA^{+}CD62L^{+}CD127^{+}CD27^{+}CD28^{+}CD95^{-}$,
- T_{SCM} : $CD45RA^{+}CD62L^{+}CD127^{+}CD27^{+}CD28^{+}CD95^{+}$.

Процентное соотношение исследуемых субпопуляций представлено на рисунке 3.13.

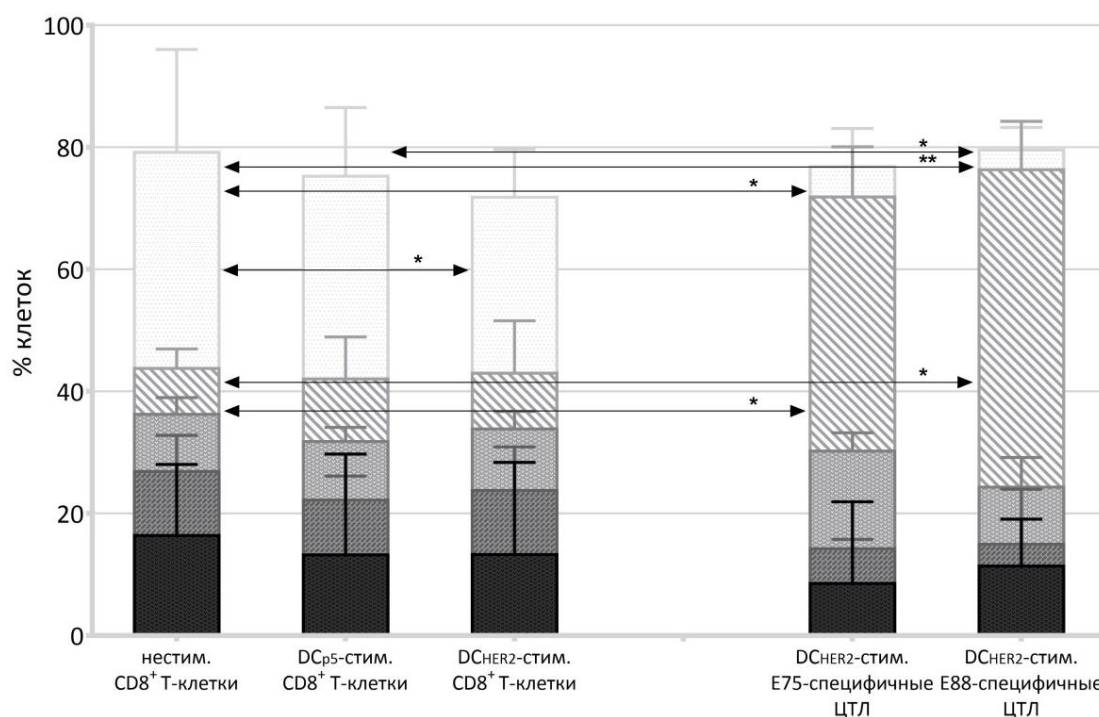


Рисунок 3.13 — Субпопуляционный состав исследуемых Т-клеток. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала (верхний квартиль отображен). Стрелками обозначены статистически значимые различия, * — $p \leq 0,05$, ** — $p < 0,01$. (Friedman test with Dunn's multiple comparisons test, $n = 6$).

Примечание: три левых столбца — субпопуляционный состав общих популяций $CD8^+$ Т-лимфоцитов. Два правых столбца — субпопуляционный состав популяций E75- и E88-специфичных $CD8^+$ Т-лимфоцитов. Исследуемые субпопуляции: T_N — наивные Т-лимфоциты, T_{SCM} — Т-клетки памяти со свойствами стволовых клеток, T_{CM} — Т-клетки центральной памяти, T_{EM} — Т-клетки эффекторной памяти, T_{EMRA} — терминально-дифференцированные цитотоксические Т-лимфоциты.

При сравнении распределения исследуемых субпопуляций внутри популяций $CD8^+$ Т-клеток не было выявлено достоверных различий между выборками не активированных *in vitro* $CD8^+$ Т-клеток (рисунок 3.13, первый слева столбец), ДК_{HER2}-активированных $CD8^+$ Т-лимфоцитов (рисунок 3.13, третий слева столбец) и ДК_{p5}-активированных $CD8^+$ Т-лимфоцитов (рисунок 3.13, второй слева столбец), в отношении всех субпопуляций за исключением субпопуляции клеток с фенотипом T_N , доля которых статистически значимо снизилась в общем пуле $CD8^+$ Т-клеток после сокультивирования с ДК_{HER2}. Таким образом, на уровне популяции всех $CD8^+$ Т-клеток исследуемой культуры РВМС не видно существенных сдвигов

в субпопуляционном составе после активации как HER2-трансфицированными ДК, так и р5-трансфицированными ДК, но видна тенденция к активации CD8⁺ Т-лимфоцитов, проявляющаяся в сокращении процента наивных Т-клеток в популяции ДК_{HER2}-активированных CD8⁺ Т-лимфоцитов по сравнению с неактивированными клетками.

В популяциях E75- и E88-специфичных CD8⁺ Т-клеток (два крайних правых столбца на рисунке 3.13) наблюдаются схожие паттерны в распределении процентных долей рассматриваемых субпопуляций (нет достоверных различий), при этом распределение субпопуляций внутри HER2-специфичных Т-клеток обеих специфичностей существенно отличается от такового для пула нестимулированных CD8⁺ Т-клеток: наблюдается существенное более низкое содержание клеток с фенотипом T_N (4,9% T_N среди E75-специфичных ЦТЛ и 3,2% среди E88-специфичных ЦТЛ против 35,5% среди нестимулированных CD8⁺ Т-клеток, 33,3% среди ДК_{р5}-стимулированных CD8⁺ Т-клеток и 28,8% среди ДК_{HER2}-стимулированных CD8⁺ Т-клеток) и существенно более высокий процент клеток с фенотипом T_{SCM} (41,6% и 52,0%, соответственно, против 7,5%, 10,2% и 9,1, соответственно).

Известно, что уровень экспрессии маркеров CD27 и CD28 — молекул, играющих важную роль в дополнительной стимуляции Т-клеточного рецептора — может меняться у клеток таких субпопуляций, как T_{EMRA}, T_{EM} и T_{SCM}, указывая на изменение степени дифференцированности клеток внутри данных субпопуляций [Fritsch et al., 2005; Okada et al., 2008]. Поэтому для оценки степени зрелости исследуемых HER2-специфичных T_{EMRA}-, T_{EM}- и T_{SCM}-клеток мы провели анализ экспрессии CD27 и CD28 клетками данных субпопуляций. Результаты представлены на рисунке 3.14.

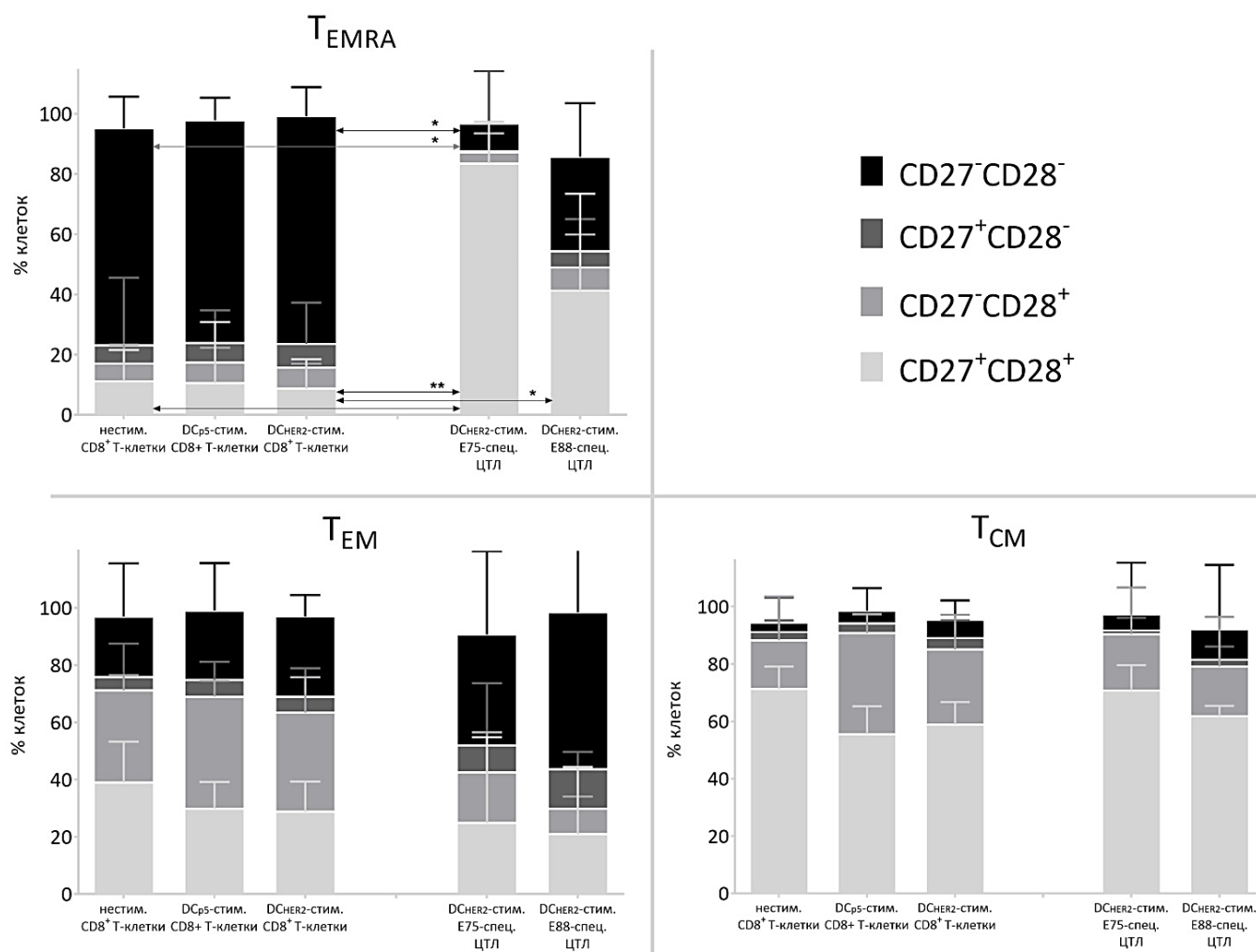


Рисунок 3.14 — Относительное содержание клеток, экспрессирующих маркеры CD27 and CD28 в субпопуляциях T_{EMRA}, T_{EM} и T_{CM} среди CD8⁺ Т-клеток (три левых столбца на каждой из диаграмм) и среди HER2-specific ЦТЛ (два правых столбца на каждой из диаграмм). Стрелками обозначены статистически значимые различия; без звездочки — $p < 0,1$, * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$ (Friedman test, Dunn's multiple comparisons test, $n=6$).

Примечание: три левых столбца на каждой из диаграмм — субпопуляционный состав общих популяций CD8⁺ Т-лимфоцитов. Два правых столбца на каждой из диаграмм — субпопуляционный состав популяций E75- и E88-специфичных CD8⁺ Т-лимфоцитов.

Клетки с фенотипом T_{EMRA} в общем пуле CD8⁺ Т-клеток в большей степени представлены дубль-негативными клетками, что указывает на высокую степень дифференцировки клеток, при этом распределение экспрессии данных маркеров в субпопуляции T_{EMRA} HER2-специфичных ЦТЛ отличается преобладанием CD27⁺CD28⁺ клеток и более низким содержанием CD27⁻CD28⁻клеток.

Клетки с фенотипом T_{SCM} в большей степени представлены $CD27^+CD28^+$ клетками, клетки с фенотипом T_{EM} общем пуле $CD8^+$ Т-клеток в сравнимых соотношениях представлены $CD27^+CD28^+$, $CD27^-CD28^+$, $CD27^-CD28^-$ клетками, и в незначительной степени $CD27^+CD28^-$, при этом наблюдается некоторая тенденция к увеличению содержания клеток с фенотипом $CD27^-CD28^-$ внутри популяций антиген-специфичных ЦТЛ по сравнению с клетками общего пула $CD8^+$ Т-клеток.

Таким образом, используемый подход активации HER2-специфического иммунного ответа с помощью ДК, трансфицированных эпитопами HER2, приводит к снижению процента наивных $CD8^+$ Т-клеток, что говорит о наличии выраженного активационного процесса в пуле цитотоксических Т-лимфоцитов. Субпопуляционный состав ДК_{HER2}-активированных E75-специфичных и E88-специфичных ЦТЛ не имеет значимых отличий в соотношении долей субпопуляций. При этом распределение субпопуляций внутри обеих популяций HER2-специфичных Т-клеток обнаруживает существенный сдвиг в сторону сокращения количества наивных Т-клеток и увеличения процента T_{SCM} клеток, по сравнению с распределением субпопуляций Т-клеток в общих популяциях $CD8^+$ Т-клеток.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Возможность использования дендритных клеток для эффективной стимуляции специфического противоопухолевого иммунитета широко исследуется во всем мире. Широкое распространение получили, в частности, дендритно-клеточные вакцины [Gelao et al., 2014]. Ряд исследований подтверждает способность зрелых нагруженных антигеном ДК успешно представлять опухолевые антигены Т-лимфоцитам как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* [Jeras et al., 2005; Boudreau et al., 2011; Курилин и др., 2013]. Однако до сих пор поводом для дискуссий является вопрос, способен ли эндогенно активированный Т-клеточный ответ опосредовать регрессию опухолей, поскольку прогрессирование опухоли часто наблюдается даже в присутствии высокого уровня циркулирующих в крови или опухоль-инфильтрированных Т-клеток [Qin et al., 2004; Willimsky, Blankenstein, 2005]. В то же время, в научной литературе приводятся случаи успешной активации противоопухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов в условиях *ex vivo*, вне иммуносупрессирующего влияния опухоли, с дальнейшим адоптивным переносом активированных Т-клеток, которые в последствии сохраняют способность элиминировать опухолевые клетки в организме больного [Bernhard et al., 2008].

Настоящее исследование направлено на изучение особенностей фенотипа и функций цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам белка HER2/neu, полученных в ходе генерации специфического цитотоксического клеточного иммунного ответа в условиях *in vitro* с использованием аутологичных дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы белка HER2/neu, и с последующим выделением полученных антиген-специфичных Т-клеток по технологии стрептамеров. Основным преимуществом предлагаемого подхода является сочетание протокола генерации специфического цитотоксического противоопухолевого Т-клеточного иммунного ответа с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией,

кодирующей иммуногенные эпитопы HER2/neu, и технологии стрептамеров, обеспечивающей изоляцию функционально активных Т-клеток с высоким уровнем жизнеспособности.

Изоляция и идентификация антиген-специфичных Т-клеток подразумевает выбор конкретных эпитопов антигена, против которого будет направлен специфический иммунный ответ, и обязательную HLA-рестрикцию клеток и используемых МНС-содержащих реагентов, поскольку сама процедура изоляции основана на уникальном взаимодействии ТКР и антигенного пептида, представленного в комплексе с молекулами МНС. Мы остановили свой выбор на генотипе HLA A*02, поскольку данная вариация HLA является наиболее распространенным семейством аллелей HLA-A в человеческой популяции [Chen et al., 2012]. При этом, как показал анализ распределения аллелей HLA-A в человеческих популяциях пяти континентов, A*02:01 является одним из немногих аллелей HLA класса I, который встречается в наибольшем количестве изученных человеческих популяций [Middleton et al., 2000].

Нами был исследован цитотоксический потенциал цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам опухоль-ассоциированного антигена HER2/neu. Были выбраны иммуногенные эпитопы HER2/neu, характеризующиеся наибольшим сродством к HLA-A*02 аллелю главного комплекса гистосовместимости, и, соответственно, наиболее эффективно распознаваемые Т-лимфоцитами в контексте с HLA-A*02: эпитопы E75 (HER2 p369–377, KIFGSLAFL) и E88 (HER2 p689-697, RLLQETELV) [Rongcun et al., 1999].

Полученные нами результаты оценки содержания HER2-специфичных ЦТЛ в периферической крови здоровых доноров и пациентов с HER2-гиперэкспрессирующим раком молочной железы в анамнезе подтверждают формирование специфического иммунного ответа против опухоль-ассоциированного антигена HER2/neu в ответ на развитие HER2/neu-ассоциированного злокачественного процесса, не смотря на тот факт, что данный антиген представляет собой рецептор семейства факторов эпидермального роста, в норме присутствующий на эпителиальных клетках ряда внутренних органов

[English et al., 2013], и не является чужеродным антигеном в полном смысле. В 2004 году Woll M.M. и соавторы показали, что процент CD8⁺ Т-клеток, специфичных к эпитопу E75 белка HER2/neu, составили порядка 0,2-0,3% от общего пула лимфоцитов периферической крови пациентов с HER2-позитивным РМЖ [Woll et al., 2004]. Эти данные согласуются с полученными нами результатами. Но нас также интересовал вопрос, являются ли значения порядка 0,2% в крови пациентов результатом развития специфического клеточного ответа на гиперэкспрессию антигена HER2/neu в организме, или же они указывают на отсутствие клональной экспансии HER2-специфичных ЦТЛ, не превышая значения содержания данных клеток в крови здоровых людей. Данные нашего сравнения пациентов и здоровых доноров, таким образом, позволили прояснить, что увеличение клонов ЦТЛ, специфичных к эпитопам HER2/neu, имеет место в организме пациентов с РМЖ.

Известно, что правильное представление антигенов играет решающую роль в генерации иммунного ответа. Самый простой подход к антигенной нагрузке АПК в условиях *in vitro* — добавление антигенного пептида в культуру клеток, обеспечивающее захват и процессинг антигена по МНС II пути. Преимуществом метода можно назвать простоту протокола нагрузки. Использование нуклеиновых кислот как источник антигена так же является распространенным способом антигенной нагрузки. При наличии достаточного количества материала мРНК может быть выделена непосредственно из опухолевых клеток и использована для трансфекции. ДНК более стабильна и более удобна для работы по сравнению с РНК [Mitchell, Nair, 2000; Banchereau, Palucka, 2005; Sennikov et al., 2016]. К настоящему моменту ряд исследований, использующих ДК, трансфицированные невирусными ДНК-векторами, показал, что нагруженные таким образом ДК могут активировать эффективный противоопухолевый иммунный ответ [Deleo et al., 1997; Banchereau, Palucka, 2005; Gattinoni et al., 2006]. При этом преимущество нуклеофекции перед другими невирусными стратегиями доставки ДНК исследователи связывают с тем, что нуклеофекция позволяет доставлять молекулы не только в цитоплазму, что обычно свойственно остальным невирусным методам трансфекции, но и непосредственно в ядро клетки [Brunner et al., 2002; Bradburne et al., 2009].

Исследования, сравнивающие иммуногенность незрелых и зрелых ДК, показали, что созревание дендритных клеток является необходимым условием для индукции противоопухолевого иммунного ответа в организме пациентов с онкопатологиями [Jonuleit et al., 2001; de Vries et al., 2003; Turnis, Rooney, 2010]. Показано, что использование зрелых ДК ассоциируется с лучшим клиническим исходом по сравнению с незрелыми дендритными клетками [McIlroy, Gregoire, 2003]. Кроме того, в литературе представлены данные о том, что вакцинация незрелыми ДК может оказывать обратный эффект на ЦТЛ и запускать развитие антиген-специфической толерантности [Dhodapkar et al., 2001; Gelao et al., 2014]. В настоящей работе для стимуляции цитотоксических Т-лимфоцитов использовались зрелые дендритные клетки, нагруженные антигеном. Мы показали, что генерируемые в исследовании зрелые ДК характеризуются значимо большим процентом клеток, экспрессирующих высокоспецифичный маркер зрелых дендритных клеток — CD83, — и костимуляторные молекулы CD86, по сравнению с незрелыми ДК, что подтверждает эффективность протокола получения зрелых ДК. Кроме того, об эффективной дифференцировке моноцитов в дендритные клетки свидетельствует значимое повышение процента клеток, экспрессирующих маркеры ДК (CD86, HLA-DR, CD11c, HLA-DR/CD11c) во фракции зрелых ДК по сравнению с фракцией прилипающих МНК. Снижение процента клеток, экспрессирующих популяционный маркер моноцитов, макрофагов и нейтрофилов других CD14, с возрастанием степени зрелости в ряду сравниваемых фракций указывает на то, что в полученных фракциях преобладают именно дендритные клетки, а не другие популяции клеток, несущие общие с ДК клеточные маркеры. Направленная дифференцировка полученных клеток в сторону зрелых дендритных клеток была подтверждена также с помощью оценки эндоцитозной активности по захвату молекул FITC-декстрана, которая показала снижение способности к эндоцитозу у клеток на стадии зрелых ДК, по сравнению с незрелыми ДК.

Помимо выбора условий оптимальной антигенной нагрузки антиген-представляющих клеток, открытым также остается вопрос о выборе клеточного звена на роль главного противоопухолевого агента, который должен входить в

состав клеточного препарата для адоптивной Т-клеточной иммунотерапии. В литературе встречаются подходы с использованием как популяций клеток-эффекторов одного типа — только $CD4^+$ Т-клетки/ только $CD8^+$ лимфоциты [Bernhard et al., 2008; Friedman et al., 2012; Matsuzaki et al., 2015], так и смешанные культуры Т-хелперных и Т-киллерных популяций и\или других моноклеарных клеток, участвующих в противоопухолевом ответе [Moeller et al., 2007; Sommermeyer et al., 2016; Turtle et al., 2016]. Многие исследователи подчеркивают, что субпопуляции Т клеток играют синергическую роль в реализации иммунного ответа. В этой связи последние годы действительно наблюдается повышение интереса к хелперной популяции Т-клеток в контексте противоопухолевой иммунотерапии. De Wolf С. и соавторы предполагают скорое появление клеточных препаратов, специфически комбинирующих $CD8^+$ с $CD4^+$ Т-клетками в клинических испытаниях не только I и II, но и III фазы [de Wolf et al, 2018].

При этом также не теряют актуальности подходы по адоптивному переносу «чистых», гомогенных популяций антиген-специфичных ЦТЛ крови или опухоль-инфильтрированных Т-клеток [Bernhard et al., 2008; Dudley et al., 2008; Perica et al., 2015]. Это связано с тем, что эффективность генерируемого противоопухолевого иммунного ответа, определяемая выраженностью его цитотоксических свойств, может быть снижена из-за большой примеси клеток иных типов и функций в составе клеточного препарата [Halle et al., 2017]. Полученные нами результаты также подтверждают увеличение эффективности специфического противоопухолевого иммунного ответа при использовании чистых популяций антиген-специфичных Т-клеток. Полученные нами культуры E75- и E88-специфичных клеток более чем на 90% представлены $CD8^+$ Т-клетками заданной антигенной специфичности. При этом данные популяции оказывают более выраженный цитотоксический эффект на HER2-экспрессирующие клетки линии MCF-7, продуцируют большее количество $IFN-\gamma$ в ответ на предъявление клеток-мишеней, а кроме того субпопуляционный состав E75- и E88-специфичных ЦТЛ характеризуется общим повышением содержания клеток памяти по сравнению с

общими популяциями CD8⁺ (как с нестимулированными *in vitro*, так и с ДК_{p5-} и с ДК_{HER2}-стимулированными).

Для обнаружения и выделения целевой популяции HER2-специфичных Т-лимфоцитов из смешанной культуры МНК в работе применялась технология обратимого окрашивания антиген-специфичных клеток Streptamer technology [Neudorfer et al., 2007]. Поскольку разрабатываемый протокол предполагается использовать в дальнейшем для создания клеточной вакцины для адоптивного переноса пациентам с онкологическими диагнозами, принципиально важно было использовать технологию окрашивания антиген-специфичных клеток, позволяющую проводить полную диссоциацию окрашивающих реагентов с поверхности клеток, с возвращением поверхностных рецепторов лимфоцитов в инактивированное состояние и сохранением жизнеспособности и функций выделяемых клеток по завершении процедуры окрашивания и изоляции. Согласно актуальным данным научной литературы, технология стрептамеров является наиболее оптимальной в этом отношении, что подтверждается рядом исследований [Bouquié et al., 2009; Schmitt et al., 2011; Wang et al., 2013; van Loenen et al., 2014].

Эффективность проводимой процедуры магнитной сортировки HER2-специфичных ЦТЛ была оценена с помощью анализа содержания CD8-позитивных Т-лимфоцитов в выделенной популяции после окрашивания клеток антителами к CD8. Это связано с тем, что в силу сложности протокола окрашивания клеток антиген-специфичными реагентами, который требует наличия большого количества клеток, проведение этапа окрашивания целевых клеток стрептамерами непосредственно после магнитной сортировки оказалось невозможным. Таким образом, об эффективности проведения магнитной сепарации косвенно свидетельствует выявленный высокий процент (до 97,3%) CD8-положительных клеток. В пользу чистоты полученной популяции также говорит тот факт, что в опытной пробе антиген-специфичных клеток не обнаруживались клетки моноцитарного пула (по показателям прямого и бокового светорассеивания), а также клетки иной морфологии, кроме клеток лимфоцитарного пула. Кроме того, сама коммерческая технология выделения антиген-специфичных Т-клеток

стрептамерами, использованная в работе, основана на взаимодействии ТКР с HLA-мультимерными комплексами, несущими антигенный пептид E75 или E88, что исключает возможность сортировки клеток других специфичностей, поскольку связывание с антигенным пептидом, представленным в комплексе с МНС I класса возможно только с CD8⁺ Т-лимфоцитами, специфичными к данному пептиду.

Количество клеток в выделенной фракции антиген-специфичных клеток варьировало от донора к донору, и составляло в среднем $0,5-1 \times 10^5$ клеток. Для наработки большего количества клеток был оптимизирован протокол стимуляции пролиферации популяций антиген-специфичных Т-лимфоцитов путем культивирования в присутствии коктейля цитокинов, содержащего 50нг/мл IL-2, 50нг/мл IL-7, 50 нг/мл IL-15. Выбор цитокинов обусловлен литературными данными, указывающими на роль перечисленных цитокинов в дифференцировке и пролиферации Т-клеток [Morris et al., 2009; Caserta et al., 2010].

В настоящее время основным методом оценки гетерогенности Т-клеточного пула периферической крови является проточная цитометрия. Основным фенотипическим признаком Т-клеток памяти принято считать появление изоформы CD45RO⁺ взамен изоформы CD45RA⁺. В комбинации с данными маркерами для фенотипического определения субпопуляций CD8⁺ Т-клеток памяти используют молекулы CD62L и CCR7, опосредующие хоминг клеток в лимфоидные органы [Кудрявцев, 2014; Mahnke et al, 2013]. Стоит отметить, что единых общепринятых фенотипических критериев разделения клеток памяти на субпопуляции до сих пор нет.

Показано, в частности, что CD8⁺ Т-клетки центральной памяти, продуцирующие большое количество IL-2, но низкий уровень эффекторных цитокинов, обладают фенотипом CD45RA⁻CD45RO⁺CCR7⁺CD62L⁺, отличаясь от наивных Т-клеток только изоформой CD45 в данном ряду маркеров, и способны к хомингу в лимфоидные органы. А CD8⁺ Т-клетки эффекторной памяти, продуцирующие высокий уровень IFN- γ и содержат гранулы перфорины и гранзима, отличаются от T_{CM} отсутствием экспрессии CCR7 и CD62L.

Добавление в панель еще двух важных маркеров — молекул CD27 и CD28, отвечающих за костимуляцию ТКР, — позволяет оценить степень дифференцированности исследуемых Т-клеток. К примеру, некоторые исследователи к клеткам эффекторной памяти T_{EM} относят клетки с фенотипом $CD45RO^+CCR7^-CD62L^-CD27^-CD28^-$, а $CD45RO^+CCR7^-CD62L^-CD27^-CD28^+$ клетки обособляют как «переходные» Т-клетки памяти, более дифференцированные, чем T_{CM} клетки, но менее дифференцированные, чем T_{EM} по ряду фенотипических признаков [Fritsch et al., 2005; Okada et al., 2008] и величине пролиферации в ответ на действие IL-15 *in vivo* [Picker et al., 2006, Lugli et al., 2010]. Терминально-дифференцированные $CD45RA^+CCR7^-CD62L^-$ Т-клетки, негативные по экспрессии CD27 и CD28 представляют собой короткоживущие цитотоксические Т-лимфоциты с наиболее выраженными эффекторными свойствами, которые способны активироваться под действием непрофессиональных АПК, но погибают сразу после реализации своей цитотоксической функции [Sallusto et al., 2004].

Т-клетки памяти со свойствами стволовых клеток были впервые обнаружены в 2005 году в периферической крови мышей на экспериментальной модели реакции трансплантат-против-хозяина [Zhang et al., 2005], а спустя некоторое время и в периферической крови человека [Gattinoni et al., 2009; Gattinoni et al., 2011]. Принципиальным отличием данных клеток от популяции наивных Т-лимфоцитов стал высокий уровень экспрессии CD95 и CD122, общим же для обеих популяций является наличие поверхностных CCR7, CD45RA, CD62L, CD27, CD28 и CD127 (IL-7R- α) при полном отсутствии CD45R0 [Gattinoni et al., 2011].

Подобранная нами панель антител для восьмицветного цитометрического анализа, включающая антитела к маркерам CD8, CD45RA, CD62L, CD27, CD28, CD95, CD127, при совместном окрашивании с антиген-специфичными реагентами технологии стрептамеров, позволила определить содержание всех основных субпопуляций циркулирующих $CD8^+$ Т-клеток в полученных популяциях E75- и E88-специфичных ЦТЛ.

Достоверное снижение процента наивных Т-клеток в популяциях E75- и E88-специфичных ЦТЛ опытных проб, а также в общей культуре $CD8^+$ клеток

периферической крови, указывает на то, что использование дендритных клеток, трансфицированных плазмидой HER2, приводит к эффективной активации специфического Т-клеточного цитотоксического иммунного ответа. Примечательно, что наибольшую долю от общего числа эпитоп-специфичных клеток составляет популяция Т-клеток памяти со свойствами стволовых клеток. Данная популяция характеризуется сочетанием выраженных эффекторных свойств и способности к длительному самоподдержанию, чем привлекает всё больший интерес у исследователей в области противоопухолевого иммунного ответа [Gattinoni et al., 2011; Кудрявцев, 2014; Flynn et al., 2015]. T_{SCM} являются наименее дифференцированными из всех субпопуляций памяти, но способны секретировать IFN- γ , IL-2 и TNF- α в ответ на α -CD3/CD2/CD28 стимуляцию [Gattinoni et al., 2011]. Данные свойства делают популяцию T_{SCM} наиболее «перспективной» для дальнейшего использования в адоптивной Т-клеточной терапии. Известно, что IL-2 необходим для поддержания жизнеспособности Т-лимфоцитов, а IL-7 и IL-15 играют ключевую роль в запуске пролиферации *in vitro*, помимо сигнала от ТКР и дополнительного сигнала от костимулирующих молекул. При этом, как упоминалось ранее, Т-клетки памяти со свойствами стволовых клеток отличаются высоким уровнем экспрессии CD122 (общей β -цепи рецептора для IL-2 и IL-15) и CD127 (IL-7R α). Упомянутые особенности фенотипа клеток памяти были учтены нами при подборе цитокинов для стимуляции пролиферации отсортированных HER2-специфичных Т-клеток: выделенные HER2-специфичные Т-лимфоциты культивировали в присутствии цитокинов IL-2, IL-7 и IL-15, в концентрации 50 нг/мл для каждого.

Для оценки способности HER2-специфичных Т-лимфоцитов лизировать HER2-экспрессирующие опухолевые клетки мы провели цитометрический анализ содержания мертвых опухолевых клеток в двухдневных совместных культурах клеток-эффекторов и клеток-мишеней, представляющих собой клетки MCF-7. Можно утверждать, что гибель клеток линии MCF-7 была опосредована именно цитотоксическим действием Т-лимфоцитов, поскольку исследуемая совместная культура содержала в себе только клетки опухолевой линии и фракцию антиген-

специфичных Т-клеток, что, с учетом поставленных контролей на спонтанную гибель клеток и цитотоксичность общей фракции МНК, исключает влияние других факторов. Следует также отметить, что в настоящем исследовании наличие цитотоксичности генерируемых HER2-специфичных Т-лимфоцитов было показано *in vitro* против клеток опухолевой линии MCF-7. Клетки данной линии отличаются от нативных клеток HER2-гиперэкспрессирующего РМЖ большими размерами, высокой жизнеспособностью в условиях *in vitro* и существенно более низкой экспрессией антигена HER2. Это дает основания предположить, что последующая отработка разработанного протокола на клетках крови пациентов с HER2-позитивным РМЖ позволит получать популяции HER2-специфичных клеток, способные проявлять более высокий уровень цитотоксичности против аутологичных опухолевых клеток прежде всего за счет более высокой экспрессии HER2/neu на поверхности аутологичных опухолевых клеток HER2-гиперэкспрессирующего рака.

Для проверки одного из возможных механизмов лизиса опухолевых клеток мы оценивали концентрацию IFN- γ в кондиционных средах от двухдневных культур клеток-эффекторов в присутствии клеток опухолевой линии MCF-7, и без него. Мы показали шестикратное увеличение продукции IFN- γ E75- и E88-специфичными ЦТЛ в ответ на предъявление клеток-мишеней, что согласуется с сокращением количества наивных клеток и увеличением содержания T_{SCM} в исследуемых популяциях. Кроме того, продукция IFN- γ эпитоп-специфичными ЦТЛ почти в два раза превысила значение таковой для популяции CD8⁺ Т-лимфоцитов, активированных в той же культуре МНК и ДК, трансфицированных плазмидой HER2, но не содержащей клеток, специфичных к эпитопам E75 и E88. Таким образом, некоторый уровень продукции IFN- γ имеет место при неспецифическом Т-клеточном иммунном ответе, однако уровень продукции IFN- γ существенно выше у CD8⁺ Т-клеток, реализующих антиген-специфическую цитотоксическую функцию.

Известно, что IFN- γ представляет собой цитокин, биологическая активность которого связана прежде всего с реализацией цитостатических, цитотоксических и

противоопухолевых механизмов в ходе адаптивного клеточного иммунного ответа. Было показано, что рекомбинантный IFN- γ участвует в антипролиферативном [Hobeika et al., 1999; Mori et al., 2008], антиангиогенном [Beatty, Paterson, 2001; Zaidi, Merlino, 2011] и проапоптотическом [Chawla-Sarkar et al., 2003] эффектах против раковых клеток. IFN- γ используется в клинической практике для лечения различных злокачественных новообразований [Miller et al., 2009]. Одним из важнейших действий IFN- γ противотуморогенного характера является также повышение экспрессии молекул МНС на поверхности опухолевых клеток [Shao et al., 2017], зачастую критически важное для реализации специфической цитотоксичности эффекторными клетками, поскольку известно, что опухолевые клетки могут утрачивать экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости [Korkoloroulou et al., 1996; Tu et al., 2017].

Несмотря на достаточное количество доказательств, указывающих на роль IFN- γ в иммунном надзоре за опухолями, рядом исследований показано, что IFN- γ выполняет двойную функцию при прогрессировании рака, и его влияние на опухолевый иммунитет может быть разнонаправленным [Zaidi, Merlino, 2011]. Согласно наиболее распространенной в настоящее время точке зрения, направленность действия IFN- γ зависит от клеточного окружения и молекулярного контекста, при этом конкретных условий, при которых IFN- γ может способствовать опухолевому росту, не описано. Однако, продолжают появляться работы, показывающие мощное противоопухолевое действие данного цитокина [Martini et al., 2010; Shao et al., 2017]. На модели опухоли молочной железы мыши *in vivo* показано, что присутствие IL-7 способствует стимуляции секреции CD8⁺ Т-клетками IFN- γ с противоопухолевой активностью [Yuan et al., 2014].

В 2014 году в нашей лаборатории было проведено исследование, посвященное индукции цитотоксического иммунного ответа в смешанной культуре моноклеарных клеток условно-здоровых доноров, активированной с помощью аутологичных дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными ДНК конструкциями, кодирующими антигенные пептиды HER2, против HER2-экспрессирующих клеток линии MCF-7 [Максютов и др., 2014]. Для

доставки ДНК плазмид в дендритные клетки использовался метод магнитной трансфекции, ДНК плазмиды для нагрузки ДК были сконструированы в трех вариациях: ДНК конструкция, кодирующая не рестриктированные по HLA-A иммуногенные эпитопы HER2, конструкция, кодирующая HLA-A*020-рестриктированные иммуногенные эпитопы HER2, и конструкция, содержащая полноразмерный ген *ErbB2*, кодирующий белок HER2/neu. Максимальный процент цитотоксичности, полученный с использованием подхода, предложенного в исследовании, составил 9,65% (цитотоксичность смешанной культуры МНК и ДК, трансфицированных плазмидой, кодирующей HLA-A*02-рестриктированные иммуногенные эпитопы антигена HER2/neu).

Подход к активации специфического иммунного ответа, предложенный в настоящем исследовании, таким образом, обнаружил большую эффективность в сравнении с предыдущим исследованием, показав существенно более высокие значения цитотоксичности для популяций E75- и E88-специфичных ЦТЛ (медианы процента цитотоксичности равны 22,2% и 29,2%, соответственно), при этом достоверных отличий в значениях медиан контрольных проб между сравниваемыми исследованиями не выявлено. В числе причин повышения эффективности элиминирования опухолевых клеток может быть несколько аспектов. Прежде всего, это может быть связано с добавлением этапа изоляции HER2-специфичных клеток из смешанной культуры МНК и ДК, и их наработки, что приводит к получению эффекторных популяций, до 90% клеток в которых представлены CD8⁺ Т-лимфоцитами заданной специфичности. Кроме того, причиной может служить оптимизация многих этапов протокола активации иммунного ответа, использование метода нуклеофекции для трансфекции дендритных клеток, использование плазмиды HER2, кодирующей 2 иммуногенных эпитопа, выбор самих эпитопов и др.

Суммируя всё вышесказанное, можно заключить, что разработанный протокол получения антиген-специфичных противоопухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов, основанный на стимуляции моноклеарных клеток зрелыми аутологичными ДК, полученными *in vitro* из моноцитов периферической крови,

трансфицированными ДНК конструкцией, кодирующей эпитопы опухоли-ассоциированного белка HER2, с последующим выделением целевой популяции с помощью технологии обратимого окрашивания антиген-специфичных клеток стрептамерами и наработкой выделенных цитотоксических Т-лимфоцитов путем культивирования в присутствии коктейля цитокинов IL-2, IL-7 и IL-15, является эффективным и позволяет получать чистые популяции клеток, способные лизировать опухолевые клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований был разработан протокол получения HER2-специфичных Т-лимфоцитов с использованием дендритных клеток, трансфицированных плазмидой, кодирующей иммуногенные эпитопы E75 и E88 белка HER2, магнитной сепарации HER2-специфичных ЦТЛ и наработки выделенных ЦТЛ с помощью цитокинов IL-2, IL-7, IL-15. Разработанный протокол стимуляции культуры моноклеарных клеток аутологичными ДК, трансфицированными ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы белка HER2/neu, позволяет в разы увеличить содержание E75- и E88-специфичных Т-лимфоцитов, по сравнению с содержанием данных клеток в культуре нестимулированных МНК периферической крови здоровых индивидов. При этом достоверно большее значение процента HER2-специфичных Т-клеток в культурах ДК_{HER2}-стимулированных МНК по сравнению таковым для культур ДК_{p5}-стимулированных МНК подтверждает, что клональная экспансия HER2-специфичных Т-лимфоцитов в опытных пробах связана непосредственно с активацией лимфоцитов дендритными клетками, трансфицированными плазмидой, кодирующей эпитопы HER2/neu, и не связана с неспецифической активацией Т-клеток дендритными клетками, трансфицированными другой плазмидой или других типов антиген-презентирующих клеток, присутствующих в культурах МНК условно-здоровых доноров.

Показано наличие HER2-специфичных Т-лимфоцитов в крови условно-здоровых доноров и значимое более высокое их содержание в крови пациентов с HER2-гиперэкспрессирующим раком молочной железы в анамнезе. Обнаруженные значения содержания HER2-специфичных Т-клеток в периферической крови пациентов с HER2-позитивным раком молочной железы согласуются с данными научной литературы. При этом показанные отличия от значений содержания HER2-специфичных Т-клеток в периферической крови условно-здоровых доноров позволяют сделать вывод, что значения порядка 0,2% и 0,1% не отражают

«фоновый» уровень содержания E75- и E88-специфичных ЦТЛ, соответствующий таковому у здоровых индивидов, а указывают на наличие HER2-специфического иммунного ответа.

В ходе исследования также впервые проведено фенотипическое исследование распределения субпопуляций Т-клеток памяти внутри популяций HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов, включая определение таких субпопуляций как наивные Т-лимфоциты, Т-клетки центральной памяти, Т-клетки эффекторной памяти, Т-клетки памяти со свойствами стволовых клеток и терминально-дифференцированные Т-лимфоциты. Используемый подход активации HER2-специфического иммунного ответа приводит к снижению процента наивных $CD8^+$ Т-клеток. Показано, что субпопуляционный состав ДК_{HER2}-активированных E75-специфичных и E88-специфичных ЦТЛ не имеет значимых отличий в соотношении долей субпопуляций. При этом распределение субпопуляций внутри обеих популяций HER2-специфичных Т-клеток обнаруживает существенный сдвиг в сторону сокращения количества наивных Т-клеток и увеличения процента T_{SCM} клеток, по сравнению с распределением субпопуляций Т-клеток в общих популяциях $CD8^+$ Т-клеток.

Продemonстрировано, что полученные E75- и E88-специфичные ЦТЛ более чем на 40% представлены Т-клетками памяти со свойствами стволовых клеток, способны проявлять более выраженную цитотоксичность и отличаются более высоким уровнем продукции IFN- γ в ответ на предъявление HER2-экспрессирующих опухолевых клеток линии MCF-7, по сравнению с показателями цитотоксичности и продукции IFN- γ смешанной культуры активированных МНК.

Мы считаем, что разработанный нами подход может быть использован для разработки технологии получения антиген-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов для адоптивного Т-клеточного переноса пациентам. Получаемые таким способом Т-клетки могут быть эффективны при введении пациентам с HER2-гиперэкспрессирующими опухолями для элиминирования HER2-экспрессирующих опухолевых клеток после удаления основной опухолевой нагрузки, предотвращения рецидивов и метастазирования.

ВЫВОДЫ

1. Показано наличие цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопам E75 и E88 опухолевого антигена HER2/neu, в периферической крови здоровых индивидов и значительно более высокое их содержание в крови пациентов с HER2-позитивным раком молочной железы, что свидетельствует о наличии HER2-специфического иммунного ответа у пациентов с HER2-позитивным раком молочной железы.

2. Протокол получения HER2-специфичных Т-лимфоцитов с помощью дендритных клеток, трансфицированных плазмидой, кодирующей эпитопы белка HER2, технологии стрептамеров и магнитной сепарации антиген-специфичных клеток, позволяет повысить содержание E75-специфичных Т-лимфоцитов в среднем в 8 раз, содержание E88-специфичных Т-лимфоцитов — в среднем в 22 раза, а также позволяет получать популяции HER2-специфичных Т-лимфоцитов, содержащие порядка 71,5% $CD8^+$ клеток в культуре E88-специфичных Т-лимфоцитов и 90,2% — в культуре E75-специфичных Т-лимфоцитов, что указывает на эффективность активации HER2-специфического иммунного ответа с помощью аутологичных антиген-активированных дендритных клеток, а также на высокую чистоту выделения целевых популяций.

3. Полученные HER2-специфичные $CD8^+$ Т-лимфоциты характеризуются более высоким уровнем цитотоксичности в отношении опухолевых клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 и продуцируют большее количество IFN- γ в ответ на предъявление данных опухолевых клеток, по сравнению с общими фракциями активированных МНК и $CD8^+$ Т-лимфоцитов, не содержащими клонов E75- и E88-специфичных клеток, что указывает на наличие специфического цитотоксического ответа HER2-специфичных $CD8^+$ Т-клеток против HER2-экспрессирующих опухолевых клеток.

4. Субпопуляционный состав E75-специфичных и E88-специфичных Т-лимфоцитов культуры моноклеарных клеток и дендритных клеток,

трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы антигена HER2/neu, характеризуется значительным содержанием (более 40%) Т-клеток памяти со свойствами стволовых клеток и существенно меньшим содержанием наивных Т-клеток по сравнению с таковым в популяции CD8⁺ Т-клеток периферической крови, что свидетельствует о произошедшей активации HER2-специфичных Т-клеток.

5. Разработанный подход к активации HER2-специфического иммунного ответа, сочетающий использование дендритных клеток, трансфицированных плазмидой HER2, с выделением и наработкой антиген-специфичных Т-клеток, позволяет получать популяции E75- и E88-специфичных Т-лимфоцитов, в значительной степени представленные Т-клетками памяти и, прежде всего, Т-клетками памяти со свойствами стволовых клеток, а также способные проявлять выраженную специфическую цитотоксичность и продуцировать большее количество γ -интерферона в ответ на предъявление HER2-позитивных опухолевых клеток.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АПК — антиген-презентирующая клетка

GM-CSF — granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ДК — дендритные клетки

IL — интерлейкин

МНК — моноклеарные клетки

ОАА — опухоль-ассоциированный антиген

ПК — периферическая кровь

РМЖ — рак молочной железы

ЦТЛ — цитотоксические Т-лимфоциты

CD — cluster of differentiation

HER2 — Human epidermal growth factor receptor-2, человеческий эпидермальный фактор роста-2

HLA — Human Leukocyte Antigen, человеческий лейкоцитарный антиген

IFN — Interferon, интерферон

MHC — major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости

NK-клетки — Natural killer cells, естественные киллеры

TCR — T cell receptor, Т-клеточный рецептор

TNF — tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли

TRAIL — TNF-related apoptosis-inducing ligand

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абакушина Е. В. Метод проточной цитометрии для оценки НК-клеток и их активности. // Иммунология. — 2015. — Т. 4. — С.37–44.
2. Водолажский Д.И., Кит О.И., Могушкова Х.А. и др. Раковые тестикулярные антигены в иммунотерапии злокачественных опухолей. // Сибирский онкологический журнал. — 2017. — Т. 16(2). — С.71–81.
3. Гантиевская Ю.А., Селявко В.В. Дендритные клетки: роль в системе иммунитета. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2001. — №4. — С.5–23
4. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). // Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. — 2018. — илл. — 250 с.
5. Кит О.И., Солдатова К.И., Кутилин Д.С. и др. Раково-тестикулярные антигены в диагностике опухолей толстой кишки. // Современные проблемы науки и образования. — 2018. — № 2.
6. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки. // Российский иммунологический журнал. — 2014. — Т.8(17). — №4. — С. 947–964
7. Курилин В.В., Лопатникова Ю.А., Сенников С.В. и др. Исследование модуляции ВИЧ-специфической иммунной реакции в культуре мононуклеарных клеток с использованием дендритных клеток, нагруженных специфическим антигеном. // Иммунология. — 2011. — Т.32. — №5. — С.228–231
8. Курилин, В.В. Хантакова Ю.Н., Облеухова И.А. и др. Стимуляция дендритными клетками *in vitro* противоопухолевой цитотоксической активности мононуклеарных клеток больных колоректальным раком. // Медицинская иммунология. — 2013. — Т.15. — №3. — С. 235–246
9. Максютлов А.З., Лопатникова Ю.А., Курилин В.В. и др. Исследование эффективности индукции цитотоксического иммунного ответа мононуклеарными

клетками с помощью дендритных клеток, трансфецированных полиэпитопными конструкциями HER2/ErbB2. // Медицинская иммунология. — 2014. — Т. 16. — № 5. — С. 417–424.

10. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. // Москва «Мир». — 1984.

11. Миронова Н.Л., Панжинский Е.Э., Попова Н.А. и др. Специфически активированные дендритные клетки: клеточные вакцины против лимфосаркомы с фенотипом множественной лекарственной устойчивости. // Доклады Академии Наук. — 2009. — Т. 428. — № 4. — С. 550–555.

12. Облеухова И.А., Курилин В.В., Гончаров М.А. и др. Влияние зрелых дендритных клеток, праймированных аутологичными опухолевыми антигенами, больных эпителиальным раком яичника на стимуляцию цитотоксического иммунного ответа в культуре моноклеарных клеток. // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2013. — №3. — С.169–174.

13. Селедцов В.И., Литвинова Л.С., Гончаров А.Г. и др. Клеточные механизмы генерации иммунологической памяти // Цитокины и воспаление. — 2010. — Т.9. — №4. — С. 9–15.

14. Топтыгина А.П. Т-клетки памяти // Иммунология. — 2008. — №5. — С. 311–316.

15. Тюреева И.И. Опухолевые антигены // Цитология. — 2008. — Т. 50. — №3. — С. 189–209.

16. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. и др. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа). // Медицинская иммунология. — 2009. — Т. 11. — № 2-3. — С. 227–238.

17. Шаназаров Н.А., Сабиров А.Х, Сироткина С.М. Роль эпидермального фактора роста и его рецептора в канцерогенезе: молекулярные механизмы их действия. // Российский биотерапевтический журнал. — 2009. — Т. 8. — № 4. — С. 85–90.

18. Aarntzen E., Fidgor C., Adema C. et al. Dendritic cell vaccination and immune monitoring. // *Cancer immunology, immunotherapy*. — 2008. — Vol. 57. — № 10. — P. 1559–1568.
19. Aarntzen E., Schreibelt G., Bol K. et al. Vaccination with mRNA-electroporated dendritic cells induces robust tumor antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells responses in stage III and IV melanoma patients. // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. — 2012. — Vol. 18. — № 19. — P. 5460–70.
20. Aerts J.G., Hegmans J.P. Tumor-specific cytotoxic T cells are crucial for efficacy of immunomodulatory antibodies in patients with lung cancer. // *Cancer Res*. — 2013. — 73. — P. 2381–8.
21. Ahmed N., Brawley V.S., Hegde M. et al. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) — Specific chimeric antigen receptor — Modified T cells for the immunotherapy of HER2-positive sarcoma. // *J Clin Oncol*. — 2015. — Vol. 33. — P. 1688–1696.
22. Ahmed R., Bevan M.J., Reiner S.L. et al. The precursors of memory: models and controversies // *Nat. Rev. Immunol*. — 2009. — №9. — P. 662–668.
23. Alves N.L., Hooibrink B., Arosa F.A. et al. IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naïve CD8⁺ T cells in vitro. // *Blood*. — 2003. — №102. — P. 2541–2546.
24. Aragon-Sanabria V., Kim G.B., Dong C. From Cancer Immunoediting to New Strategies in Cancer Immunotherapy: The Roles of Immune Cells and Mechanics in Oncology. // *Biomechanics in Oncology*. — 2018. — Vol. 1092. — P. 113–138.
25. Banchereau J., Palucka A. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. // *Nature reviews. Immunology*. — 2005. — Vol.5. — P. 296–306.
26. Barry M., Bleackley R. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. // *Nat Rev Immunol*. — 2002. — Vol. 2. — № 6. — P. 401–9.

27. Batzer A.G., Rotin D., Urena J.M. et al. Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. // *Mol Cell Biol.* — 1994. — Vol.14. — 5192–201
28. Bauer C., Hees C., Sterzik A. et al. Proapoptotic and antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family regulate sensitivity of pancreatic cancer cells toward gemcitabine and T-cell-mediated cytotoxicity. // *J Immunother.* — 2015. — Vol.38. — №3. — P. 116–26.
29. Beatty G., Paterson Y. IFN-gamma-dependent inhibition of tumor angiogenesis by tumorinfiltrating CD4+ T cells requires tumor responsiveness to IFN-gamma. // *J Immunol.* — 2001. — Vol. 166. — № 4. — P. 2276–82.
30. Bernhard H., Neudorfer, J., Gebhard K. et al. Adoptive transfer of autologous, HER2-specific, cytotoxic T lymphocytes for the treatment of HER2-overexpressing breast cancer. // *Cancer immunology, immunotherapy, CII.* — 2008. — Vol.57. — № 2. — P. 271–80.
31. Berzofsky J., Terabe M., Oh S. et al. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. // *The Journal of clinical investigation.* — 2004. — Vol.113. — P. 1515–1525.
32. Binder R.J., Srivastava P.K. Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells. // *Nature immunology.* — 2005. — Vol.6. — № 6. — P. 593–9.
33. Boudreau J., Bonehill A., Thielemans K. et al. Engineering dendritic cells to enhance cancer immunotherapy. // *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy.* — 2011. — Vol.19. — P. 841–853.
34. Bouquié R. Bonnin A., Bernardeau K. et al. A fast and efficient HLA multimer-based sorting procedure that induces little apoptosis to isolate clinical grade human tumor specific T lymphocytes. // *Cancer immunology, immunotherapy: CII.* — 2009. — Vol.58. — № 4. — P.553–66.
35. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. // *Scand J Clin Lab Invest.* — 1968. — Vol. 21. — № 97.

36. Brenchley J.M., Karandikar N.J., Betts M.R. et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. // *Blood*. — 2003. — №101. — P. 2711–2720.
37. Burgess A.W., Cho H.S., Eigenbrot C. et al. An open and shut case Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. // *Mol Cell*. — 2003. — 12. — 541–52.
38. Calarota S.A., Baldanti F. Enumeration and characterization of human memory t cells by enzyme-linked immunospot assays. // *Clin Dev Immunol*. — 2013. — Vol. 2013. — Article ID 637649. — 8 p.
39. Cancer immunotherapy. Paradigms, Practices and Promise // Edited by Tyler J. Curiel. — Springer-Verlag New York. — 2013. — 486 p.
40. Casalegno-Garduño R., Schmitt A., Yao J. et al. Multimer technologies for detection and adoptive transfer of antigen-specific T cells. // *Cancer immunology, immunotherapy: CII*. — 2010. — Vol.59. — № 2. — P. 195–202.
41. Chan C.W., Housseau F. The ‘kiss of death’ by dendritic cells to cancer cells. *Cell Death Differ*. — 2008. — Vol.1. — P. 58–69.
42. Chang J.T., Palanivel V.R., Kinjyo I. et al. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. // *Science*. — 2007. — №315. — P. 1687–1691
43. Chawla-Sarkar M., Lindner D.J., Liu Y.F. et al. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis*. 2003. — Vol. 8. — № 3. — P. 237–49.
44. Chikuma S, Terawaki S, Hayashi T. et al. PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8⁺ T cell anergy in vivo. // *J Immunol*. — 2009. — Vol. 182. — № 11. — P. 682–9.
45. Choi J., Eo S. Detection of Foreign Antigen-specific CD4(+) Foxp3(+) Regulatory T Cells by MHC Class II Tetramer and Intracellular CD154 Staining. // *Immune network*. — 2013. — Vol.13. — № 6. — P. 264–74.

46. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal Biochem.* — 1987. — Vol. 162. — P. 156–9.
47. Cieri N., Camisa B., Cocchiarella F. et al. IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naïve precursors. // *Blood.* — 2013. — №121. — P. 573–584.
48. Clemente T., Dominguez M., Vieira N. et al. In vivo assessment of specific cytotoxic T lymphocyte killing. // *Methods (San Diego, Calif.).* — 2013. — Vol.61. — № 2. — P. 105–9.
49. Correa I., Plunkett T. Update on HER-2 as a target for cancer therapy HER2/neu peptides as tumour vaccines for T cell recognition // *Breast Cancer Research.* — 2001. — Vol 3. — № 6.
50. Cullen S.P., Brunet M. Granzymes in cancer and immunity. // *Cell death and differentiation.* — 2010. — Vol.17. — P. 616–623.
51. Dev K., Ak M., Husain E. Immunohistochemical expression of HER2/neu and its correlation with histological grades and age in IDC of breast. // 2013. — Vol. 3. — № 3. — P. 230–247.
52. Disis M.L. Immune regulation of cancer. // *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology.* — 2010. — Vol.28. — P. 4531–4538.
53. Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J., Schreiber R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. // *Nat Immunol.* — 2002. — Vol.3. — P. 991–998.
54. Dunn G., Koebel C., Schreiber R. Interferons, immunity and cancer immunoediting. // *Nature reviews. Immunology.* — 2006. — Vol.6. — № 11. — P. 836–48.
55. Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. The three Es of cancer immunoediting. // *Ann Rev Immunol.* — 2004. — Vol. 22. — P. 329–360.

56. Duplan V., Suberbielle C., Napper C. et al Tracking antigen-specific CD8⁺ T cells in the rat using MHC class I multimers. // Journal of immunological methods. — 2007. — Vol.320. — № 1-2. — P. 30–9.
57. Dustin, M.L. & Springer, T.A. T-cell receptor crosslinking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. // Nature. — 1989. — Vol. 341. — P. 619–624.
58. Dzionic A., Fuchs A., Schmidt P. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. // Journal of immunology. — 2000. — Vol.165. — P. 6037–6046.
59. Sotomayor E.M., Borrello I., Tubb E. et al. In vivo blockade of CTLA-4 enhances the priming of responsive T cells but fails to prevent the induction of tumor antigen-specific tolerance. // Proc Natl Acad Sci U S A. — 1999. — Vol. 96. — № 20. — P. 11476–11481.
60. English D.P., Roque D.M., Carrara L. et al. HER2/neu gene amplification determines the sensitivity of uterine serous carcinoma cell lines to AZD8055, a novel dual mTORC1/2 inhibitor. // Gynecol Oncol. — 2013. — Vol. 131. — № 3. — P. 753-8.
61. Eroglu Z., Tagawa T., Somlo G. Human epidermal growth factor receptor family-targeted therapies in the treatment of HER2-overexpressing breast cancer. // Oncologist. — 2014. — Vol. 19. — 135–50.
62. Finn O., Binder R., Brickner A. et al. Human Tumor Antigens as Targets of Immunosurveillance and Candidates for Cancer Vaccines. // Tumor-Associated Antigens: Identification, Characterization, and Clinical Applications // Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. — 2009.
63. Flynn J.K., Gorry P.R. Stem memory T cells (TSCM)-their role in cancer and HIV immunotherapies. // Clin Transl Immunology. — 2014. — Vol. 3. — №7. — e20.
64. Friedman K.M., Prieto P.A., Devillier L. Eet al. Tumor-specific CD4⁺ melanoma tumor-infiltrating lymphocytes. // J Immunother. — 2012. — Vol.35. — P. 400–8
65. Frisoni L., Mcpie L., Colonna L. et al. Nuclear autoantigen translocation and autoantibody opsonization lead to increased dendritic cell phagocytosis and presentation

of nuclear antigens: a novel pathogenic pathway for autoimmunity? // J Immunol. — 2005. — Vol. 175. — № 4. — P. 2692-2701

66. Fritsch R.D., Shen X., Sims G.P., Hathcock K. S., Hodes R.J. and Lipsky P.E. Stepwise differentiation of CD4 memory T cells defined by expression of CCR7 and CD27. // J Immunol. — 2005. — №175. — P. 6489–6497.

67. Gaestel M. MAPKAP kinases — MKs — two's company, three's a crowd. // Nat Rev Mol Cell Biol. — 2006. — Vol. 7. — P. 120–30.

68. Gasser S., Raulet D.H. The DNA damage response arouses the immune system. // Cancer Res. — 2006. — Vol. 66. — P. 3959–3962.

69. Gattinoni L., Lugli E., Pos Z., Paulos C.M., Quigley M.F., Almeida J.R. et al. A human memory T-cell subset with stem cell-like properties. // Nat Med. — 2011. — Vol. 17. — P. 1290–1297.

70. Gattinoni L., Powell D.J., Rosenberg S.A., Restifo N.P. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. // Nat Rev Immunol. — 2006. — Vol. 6. — P. 383–93.

71. Geginat J., Lanzavecchia A. and Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. // Blood. — 2003. — №101. — P. 4260–4266.

72. Gelao L., Criscitiello C., Esposito A. et al. Dendritic cell-based vaccines: clinical applications in breast cancer. // Immunotherapy. — 2014. — Vol. 6. — P. 349–60.

73. Gerlach C., van Heijst J.W., Swart E. et al. One naïve T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation. // J Exp Med. — 2010. — №207. — P. 1235–1246.

74. Goebel S.U, Iwamoto M., Raffeld M, et al. HER-2/neu expression and gene amplification in gastrinomas: Correlations with tumor biology, growth, and aggressiveness. // Cancer Res. — 2002. — Vol. 62. — P. 3702–3710.

75. Gordan J.D., Vonderheide R.H. Universal tumor antigens as targets for immunotherapy. // Cytotherapy. — 2002. — Vol. 4. — № 4. — P. 317–27.

76. Grazino D.F., Finn O.J. Tumor antigens and tumor antigen discovery. // Cancer Treatment and research. — 2005. — Vol.123. — P.89–111.

77. Grela-Wojewoda A., Niemiec J., Sas-Korczyńska B. et al. Prognostic Role of Nodal Status and Clinically Asymptomatic Valvular Insufficiency in Patients with HER2-positive Breast Cancer Treated with Chemotherapy, Radiotherapy and Trastuzumab in an Adjuvant Setting. // *Anticancer Res.* — 2015. — Vol.35. — № 7. — P. 4063–72.
78. Grigoleit G.U., Kapp M., Hebart H. et al. Dendritic cell vaccination in allogeneic stem cell recipients: induction of human cytomegalovirus (HCMV)-specific cytotoxic T lymphocyte responses even in patients receiving a transplant from an HCMV-seronegative donor. // *J Infect Dis.* — 2007. — Vol. 196. — №5. — P. 699–704.
79. Grivennikov S., Greten F., Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. // *Cell.* — 2010. — Vol.140. — P. 883–899.
80. Grywalska E., Pasiarski M., Gózdź S. et al. Immune-checkpoint inhibitors for combating T-cell dysfunction in cancer. // *Onco Targets Ther.* — 2018. — Vol. 11. — P. 6505–6524.
81. Gutierrez C., Schiff R. HER2: biology, detection, and clinical implications. // *Archives of pathology & laboratory medicine.* — 2011. — Vol. 135. — P. 55–62.
82. Halle S., Halle O., Förster R. Mechanisms and dynamics of T cell-mediated cytotoxicity in vivo. // *Trends Immunol.* — 2017. — Vol. 38. — P. 432–443.
83. Hamy A.S., Pierga J.Y., Sabaila A. et al. Stromal lymphocyte infiltration after neoadjuvant chemotherapy is associated with aggressive residual disease and lower disease-free survival in HER2-positive breast cancer. // *Ann Oncol.* — 2017. — Vol. 28. — № 9. — P. 2233–2240.
84. Heiser W.C. Gene Delivery to Mammalian Cells. // Humana Press Inc. 2004. — Vol.1. — P.317.
85. Henson S.M. and Akbar A.N. KLRG — more than a marker for T cell senescence. // *Age (Dordr).* — 2009. — №31. — P. 285–291.
86. Higano C., Schellhammer E., Small E. Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. // *Cancer.* — 2009. — Vol. 115. — № 16. — P. 3670–9.

87. Hinrichs C.S., Gattinoni L., Restifo N.P. Programming CD8+ T cells for effective immunotherapy. // *Curr Opin Immunol.* — 2006. — Vol. 18. — 363–370.
88. Hobeika A.C., Etienne W., Torres B.A. et al. IFN-gamma induction of p21(WAF1) is required for cell cycle inhibition and suppression of apoptosis. // *J Interferon Cytokine Res.* — 1999. — Vol. 19. — №12. — P.1351–61.
89. Hoon D.S., Yuzuki D., Hayashida M. et al. Melanoma patients immunized with melanoma cell vaccine induce antibody responses to recombinant MAGE-1 antigen 2 // *The Journal of Immunology.* — 1995. — Vol. 154. — P. 730–737.
90. Hubbard S.R. EGF receptor inhibition: attacks on multiple fronts. *Cancer Cell* 2005;7: 287–8.
91. Iwai Y., Terawaki S., Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. // *Int Immunol.* — 2005. — Vol. 17. — № 2. — P. 133–44.
92. Jeras M., Bergant M., Repnik U. In vitro preparation and functional assessment of human monocyte-derived dendritic cells-potential antigen-specific modulators of in vivo immune responses. // *Transplant immunology.* — 2005. — Vol. 14. — P. 231–244.
93. Jiao P., Zhang J., Dong Y.. et al. Construction and characterization of the recombinant immunotoxin RTA-4D5-KDEL targeting HER2/neu-positive cancer cells and locating the endoplasmic reticulum. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018; 102: 9585–9594.
94. Jong, de E., Smits H., Kapsenberg M. Dendritic cell-mediated T cell polarization. // *Springer seminars in immunopathology.* — 2005. — Vol. 26. — № 3. — P. 289–307.
95. Jonuleit H., Kuhn U., Muler G. et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. // *European journal of immunology.* — 1997. — Vol. 27. — № 12. — P. 3135–42.

96. Jonuleit H., Schmitt E., Steinbrink K. et al. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. // *Trends Immunol.* — 2001. — Vol. 22. — P. 394–400.
97. June C.H. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. // *J Clin Invest.* — 2007. — Vol. 117. — P. 1466–1476.
98. Jursik C., Prchal M., Grillari-Voglauer R. et al. Large-scale production and characterization of novel CD4⁺ cytotoxic T cells with broad tumor specificity for immunotherapy. // *Molecular cancer research: MCR.* — 2009. — Vol. 7. — № 3. — P. 339–53.
99. Kadowaki N., Ho S., Antonenko S. et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. // *The Journal of experimental medicine.* — 2001. — Vol. 194. — P. 863–869.
100. Knabel M., Franz T., Schiemann M. et al. Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T-cell populations and effective adoptive transfer. // *Nature medicine.* — 2002. — Vol. 8. — P. 631–637.
101. Korkolopoulou P., Kaklamanis L., Pezzella' F. et al. Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. // *British Journal of Cancer.* — 1996. — Vol. 73. — P. 148–153.
102. Kulikova E.V., Kurilin V.V., Shevchenko J.A. et al. Dendritic cells transfected with a DNA construct encoding tumour-associated antigen epitopes induce a cytotoxic immune response against autologous tumour cells in a culture of mononuclear cells from colorectal cancer patients. // *Scan J Immunol.* — 2015. — Vol 82. — №2. — P. 110–117.
103. Lalvani A., Pareek M. Interferon gamma release assays: principles and practice. // *Enferm Infecc Microbiol Clin.* — 2010. — Vol. 28. — P. 245–252.
104. Lanzavecchia A., Sallusto F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. // *Nat. Rev. Immunol.* — 2002. — №2. — P. 982–987.
105. Li D.Y., Gu C., Min J. et al. Maturation induction of human peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells // *Exp Ther Med.* — 2012. — Vol. 4. — P. 131–134.

106. Liebmann C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. // *Cell Signal.* — 2001. — Vol. 13. — P. 777–85.
107. Linggi B., Carpenter G. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. // *Trends Cell Biol.* — 2006. — Vol. 16. — P. 649–656.
108. Liu K., Caldwell Sh., Abrams K. et al. CTL Adoptive Immunotherapy Concurrently Mediates Tumor Regression and Tumor Escape. // *J Immunol.* — 2006. — Vol. 176. — № 6. — P. 3374–82.
109. Lou Y., Liu C., Kim G.J. et al. Plasmacytoid Dendritic Cells Synergize with Myeloid Dendritic Cells in the Induction of Antigen-Specific Antitumor Immune Responses. // *J Immunol.* — 2014. — Vol. 178. — P. 1534–1541.
110. Lugli E., Dominguez M.H., Bolton D.L. et al., Superior T memory stem cell persistence supports long-lived T memory. // *J Clin Invest.* — 2013. — №123. — P. 594–569.
111. Lugli E., Goldman C.K., Perera L.P. et al. Transient and persistent effects of IL15 on lymphocyte homeostasis in nonhuman primates. // *Blood.* — 2010. — №116. — P. 3238–3248.
112. Macallan D.C., Wallace D., Zhang Y. et al. Rapid turnover of effector-memory CD4(+) T cells in healthy humans. // *J. Exp. Med.* — 2004. — №194 — P. 1711–1719.
113. Mahnke Y.D., Brodie T.M., Sallusto F. et al. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets // *Eur. J. Immunol.* — 2013. — №43. — P. 2797–2809.
114. Matsuzaki J., Tsuji T., Luescher I.F. et al. Direct tumor recognition by a human CD4+T-cell subset potently mediates tumor growth inhibition and orchestrates anti-tumor immune responses. // *Sci Rep.* — 2015. — Vol. 5. — P. 1–14.
115. McKenna K., Beignon A., Bhardwaj N. Plasmacytoid dendritic cells: Linking innate and adaptive immunity. // *J Virol.* — 2005. — Vol. 79. — P. 17–27.

116. Middleton D., Williams F., Meenagh A. et al. Analysis of the Distribution of HLA-A Alleles in Populations from Five Continents. // *Hum Immunol.* — 2000. — Vol. 61. — P. 1048–1052.
117. Mir O., Berveiller P., Pons G. Trastuzumab--mechanism of action and use. // *N Engl J Med.* — 2007. — Vol. 357. — № 16. — P. 1664-5.
118. Mitchell D.A., Nair S.K. RNA-transfected dendritic cells in cancer immunotherapy. // *J Clin Invest.* — 2000. — Vol. 106. — P. 1065–1069.
119. Mittendorf E.A., Storrer C.E., Shriver C.D. et al. Evaluation of the CD107 cytotoxicity assay for the detection of cytolytic CD8+cells recognizing HER2/neu vaccine peptides. // *Breast Cancer Res Treat.* — 2005. — Vol. 92. — P. 85–93.
120. Moasser M. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. // *Oncogene.* — 2007. — Vol. 26. — № 45. — P. 6469-87.
121. Molldrem J.J., Lee P.P., Wang C. et al. Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. // *Nat Med.* — 2000. — Vol. 6. — P. 1018–1023.
122. Morris J., Lin W., Hauser C. et al. Rescue of the cardiac defect in ErbB2 mutant mice reveals essential roles of ErbB2 in peripheral nervous system development. // *Neuron.* — 1999. — Vol. 23. — P. 273–283.
123. Mortenson E.D., Fu Y-X. Adaptive Immune Responses and HER2/neu Positive Breast Cancer. // *Curr Pathobiol Rep.* — 2013. — Vol. 1. — P. 37–42.
124. Nagorsen D., Rüttinger D. Immunotherapy of colorectal cancer. // *MEMO.* — 2008. — №1. — P. 205–210.
125. Nencioni A., Grünebach F., Schmidt S.M. et al. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. // *Crit Rev Oncol Hematol.* — 2008. — Vol. 65. — P. 191–199.
126. Neudorfer J., Schmidt B., Huster K. et al. Reversible HLA multimers (Streptamers) for the isolation of human cytotoxic T lymphocytes functionally active against tumor- and virus-derived antigens. // *Journal of immunological methods.* — 2007. — Vol. 320. — № 1-2. — P. 119–31.

127. Nolan T., Hands R.E., Bustin S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR // Nat Protoc. — 2006. — Vol. 1. — N. 3. — P. 1559–1582.
128. Novellino L., Castelli C., Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. // Cancer Immunol Immunother. — 2005. — Vol. 54. — P. 187–207.
129. Obermaier B., Dauer M., Herten J. et al. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. // Biol Proced Online. — 2003. — Vol. 5. — P. 197–203.
130. Okada R., Kondo T., Matsuki F. et al. Phenotypic classification of human CD4⁺ T cell subsets and their differentiation. // Int. Immunol. — 2008. — №20. — P. 1189–1199.
131. O’Keefe J. P., Blaine K., Alegre M. L. et al. Formation of a central supramolecular activation cluster is not required for activation of naive CD8⁺ T cells. // Proc. Natl Acad. Sci. USA. — 2004. — Vol. 101. — P. 9351–9356.
132. Oliver M., Berveiler P., Pons G. Trastuzumab--mechanism of action and use. // The New England journal of medicine. — 2007. — Vol. 357. — P. 1664–1665.
133. Padhy L.C., Shih C., Cowing D. et al. Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastomas. // Cell. — 1982. — Vol. 28. — № 4. — P. 865–71.
134. Palucka K., Ueno H., Banchereau J. et al. Recent developments in cancer vaccines. // Journal of Immunology. — 2011. — Vol.186. — P. 1325–1331.
135. Patterson R.L., van Rossum D.B., Nikolaidis N. Phospholipase C-g: diverse roles in receptor-mediated calcium signaling. // Trends Biochem Sci. — 2005. — Vol. 30. — P. 688–97.
136. Perret R., Ronchese F. Memory T cells in cancer immunotherapy: which CD8⁺ T-cell population provides the best protection against tumours? // Tissue Antigens. — 2008. — Vol. 72. — № 3. — P.187–194.
137. Peters P., Borst J., Oorshot V. Cytotoxic T Lymphocyte Granules Are Secretory Lysosomes, Containing Both Perforin and Granzymes // J Exp Med. — 1991. — Vol. 173. — № 5. — P. 1099-109.

138. Picker L.J., Reed-Inderbitzin E.F., Hagen S.I. et al. IL-15 induces CD4 effector memory T cell production and tissue emigration in nonhuman primates. // J Clin Invest. — 2006. — №116. — P. 1514–1524.

139. Poehlein Ch., Hu H., Yamada H. et al. TNF Plays an Essential Role in Tumor Regression after Adoptive Transfer of Perforin/IFN- γ Double Knockout Effector T Cells. // J Immunol. — 2003. — Vol. 170. — № 4. — P. 2004-13.

140. Potter T.A., Grebe K., Freiberg B. et al. Formation of supramolecular activation clusters on fresh *ex vivo* CD8⁺ T cells after engagement of the T cell antigen receptor and CD8 by antigen-presenting cells. // Proc Natl Acad Sci USA. — 2001. — Vol. 98. — P. 12624–12629.

141. Révillion F., Bonnetterre J., Peyrat J.P. ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. // Eur J Cancer. — 1998. — Vol. 34. — № 6. — P. 791–808.

142. Ribatti D., The concept of immune surveillance against tumors: The first theories. // Oncotarget. — 2017. — Vol. 8. — № 4. — P. 7175–7180.

143. Roche, de la M., Asano Y., Griffiths G.M. Origins of the cytolytic synapse. // Nat Rev Immunol. — 2016. — Vol. 16. — № 7. — P. 421–32.

144. Romani B., Gruner S., Brang D. et al. Proliferating Dendritic Cell Progenitors in human blood. // J Exp Med. — 1994. — Vol. 180. — № 1. — P. 83-93.

145. Romero P., Zippelius A., Kurth I. et al. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8⁺ T lymphocytes. // J Immunol. — 2007. — №178. — P. 4112–4119.

146. Rongcun Y., Salazar-Onfray F., Charo J. et al. Identification of new HER2/neu-derived peptide epitopes that can elicit specific CTL against autologous and allogeneic carcinomas and melanomas. // J Immunol. — 1999. — Vol. 163. — № 2. — P. 1037–44.

147. Rosenblatt J., Avigan D. Dendritic Cells. // Allogeneic Stem Cell Transplantation. — 2003. — Ch.45. — P.807–832.

148. Rosenblatt J., Avivi I., Vasir B. et al. Vaccination with dendritic cell/tumor fusions following autologous stem cell transplant induces immunologic and clinical

responses in multiple myeloma patients. // *Clinical cancer research*. — 2013. — Vol. 19. — № 13. — P. 3640–8.

149. Rossi M., Young J. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. // *Journal of immunology*. — 2005. — Vol. 175. — P. 1373–1381.

150. Rousalova I., Krepela E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation // *International journal of oncology*. — 2010. — Vol.37. — P. 1361–1378.

151. Ruben J., van den Ancker W., Bontkes H. et al. Apoptotic blebs from leukemic cells as a preferred source of tumor-associated antigen for dendritic cell-based vaccines. // *Cancer Immunol Immunother*. — 2014. — Vol. 63. — № 4. — P. 335–45.

152. Ruiz-Saenz A., Dreyer C., Campbell M.R. et al. HER2 Amplification in Tumors Activates PI3K/Akt Signaling Independent of HER3. // *Cancer Res*. — 2018. — Vol. 78. — № 13. — P. 3645–3658.

153. Sabado R., Bhardwaj N. Dendritic cell immunotherapy. // *Annals of the New York Academy of Sciences*. — 2013. — Vol.1284. — P. 31–45.

154. Sabatté J., Maggini J., Nahmod K. et al. Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. // *Cytokine & growth factor reviews*. — 2007. — Vol. 18. — № 1-2. — P. 5–17.

155. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. // *Ann. Rev. Immunol*. — 2004. — №22. — P. 745–764.

156. Sallusto F., Lenig D., Forster R. et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. // *Nature*. — 1999. — №401. — P. 708–712.

157. Samji T, Khanna KM. Understanding Memory CD8+ T cells. // *Immunol Let*. — 2017. — Vol. 185. — P. 32–39.

158. Sandel M., Alisher R., Dadabayev A. et al. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Dendritic Cells in Colorectal Cancer: Role of Maturation Status and Intratumoral Localization tumor-Infiltrating Dendritic Cells in Colorectal. // *Clin Cancer Res*. — 2005. — Vol. 11. — № 7. — P. 2576–82.

159. Sashchenko L.P., Dukhanina E.A., Shatalov Y.V. et al. Cytotoxic T lymphocytes carrying a pattern recognition protein Tag7 can detect evasive, HLA-negative but Hsp70-exposing tumor cells, thereby ensuring FasL/Fas-mediated contact killing. // *Blood*. — 2007. — Vol. 110. — № 6. — P. 1997–2004.

160. Scaltriti M. and Baselga J. The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway: A Model for Targeted Therapy. // *Clinical Cancer Research*. — 2006. — № 12. — P.5268–5272.

161. Schadendorf D., Ugurel S., Shuler-Thurner B. et al. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. // *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2006. — Vol.17. — № 4. — P.563–70.

162. Schmidt T., Sester M. Detection of Antigen-Specific T Cells Based on Intracellular Cytokine Staining Using Flow-Cytometry. // *Virus-Host Interactions: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. — 2013. — Vol.1064. — P. 267–274.

163. Schmidt T., Skerra A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. // *Nature protocols*. — 2007. — Vol. 2. — P. 1528–1535.

164. Schmitt A., Tonn T., Busch D. et al. Adoptive transfer and selective reconstitution of streptamer-selected cytomegalovirus-specific CD8⁺ T cells leads to virus clearance in patients after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. // *Transfusion*. — 2011. — Vol. 51. — № 3. — P. 591–9.

165. Schnitzer J., Berzel S., Fajardo-Moser M. et al. Fragments of antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes induce protective immunity against *Leishmania major*. // *Vaccine*. — 2010. — Vol.28. — №36. — P. 5785–93.

166. Schreiber R.D., Old L.J., Smyth M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. // *Science*. — № 331. — P. 1565–1570.

167. Sennikov S.V., Khantakova J.N., Kulikova E.V. et al. Modern strategies and capabilities for activation of the immune response against tumor cells. // *Tumour Biol.* — 2017. — Vol. 39. — № 5.
168. Sennikov S.V., Shevchenko J.A., Kurilin V.V. et al. Induction of an antitumor response using dendritic cells transfected with DNA constructs encoding the HLA-A*02:01-restricted epitopes of tumor-associated antigens in culture of mononuclear cells of breast cancer patients. // *Immunologic Research.* — 2016. — Vol. 64. — №1. — P.171–180.
169. Shaw R.J., Cantley L.C. Ras, PI(3)K, and mTOR signaling controls tumour cell growth. // *Nature.* — 2006. — № 441. — P. 424–30.
170. Shieh A.C. Biomechanical forces shape the tumor microenvironment. // *Ann Biomed Eng.* — 2011. — № 39. — P. 1379–1389.
171. Shih C., Padhy L.C., Murray M. et al. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. // *Nature.* — 1981. — Vol. 290. — № 5803. — P. 261–4.
172. Smith C., Dulphy N., Salio M. et al. Immunotherapy of colorectal cancer. // *British medical bulletin.* — 2002. — Vol.64. — P. 181–200.
173. Sommermeyer D., Hudecek M., Kosasih P.L. et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8⁺ and CD4⁺ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. // *Leukemia.* — 2016. — Vol. 30. — P. 492–500.
174. Stinchcombe J.C., Majorovits E., Bossi G. et al. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. // *Nature.* — 2006. — Vol. 443. — P. 462–465.
175. Streptamer ® Manual. // 2005. — Vol. 49. — P. 1–16.
176. Subbiah I.M., Gonzalez-Angulo A.M. Advances and Future Directions in the Targeting of HER2-positive Breast Cancer: Implications for the Future. // *Current treatment options in oncology.* — 2013. — Vol. 2.
177. Svensson A., Nordstrom I., Sun J. et al. Protective immunity to genital herpes simplex (correction of simpex) virus type 2 infection Is Mediated by T-bet 1. // *J Immunol.* — 2005. — Vol. 174. — № 10. — P. 6266-73.

178. Tachtsidis A., McInnes L. M., Jacobsen N. et al. Minimal residual disease in breast cancer: an overview of circulating and disseminated tumour cells. // *Clin Exp Metastasis*. — 2016. — Vol. 33. — P. 521–550.

179. Tendeloo V., Velde A., Driessche A. et al. Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. — 2010. — Vol. 107. — № 31. — P. 13824–9.

180. Turnis M.E., Rooney C.M. Enhancement of dendritic cells as vaccines for cancer. // *Immunotherapy*. — 2010. — Vol. 2. — P. 847–862.

181. Vaught D.B., Stanford J.C., Young C. et al. HER3 is required for HER2-induced preneoplastic changes to the breast epithelium and tumor formation. // *Cancer Res*. — 2012. — Vol. 72. — № 10. — P. 2672–82.

182. Vivanco I., Sawyers C.L. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. // *Nat Rev Cancer*. — 2002. — Vol. 2. — P. 489–501.

183. Vliet S., Dunnen J., Gringhuis S. et al. Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity// *Current opinion in immunology*. — 2007. — Vol. 19. — № 4. — P. 435–40.

184. Vries, de I., Eggert A., Scharenborg N. et al. Phenotypical and functional characterization of clinical grade dendritic cells. // *J Immunother*. — 2002. — Vol. 25. — № 5. — P. 429–38.

185. Wen Y.Y., Hu X.S. Anti-tumor activity of dendritic cell-cytokine induced killer cells (DC-CIKs) sensitized to HER2 against HER-positive breast cancer cells. // *Genet Mol Res*. — 2016. — Vol. 15. — P. 1–8.

186. Wieduwilt M.J. and Moasser M.M. The Epidermal Growth Factor Receptor Family: Biology Driving Targeted Therapeutics. // *Cellular and Molecular Life Sciences*. — 2008. — Vol. 65. — P. 1566–1584.

187. Wierecky J., Muller M., Wirths S. et al. Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients. // *Cancer research*. — 2006. — Vol. 66. — № 11. — P. 5910–8.

188. Wolf, de C., van de Bovenkamp M., Hoefnagel M. Regulatory perspective on in vitro potency assays for human T cells used in anti-tumor immunotherapy. // *Cytotherapy*. — 2018. — Vol. 20. — P. 601–622.
189. Woll M.M., Fisher C.M., Ryan G.B. et al. Direct measurement of peptide-specific CD8⁺ T cells using HLA-A2:Ig dimer for monitoring the in vivo immune response to a HER2/neu vaccine in breast and prostate cancer patients. // *J Clin Immunol*. — 2004. — Vol. 24. — P. 449–461.
190. Wurzenberger C. Dendritic cell vaccines in tumor immunotherapy: Immune activation strategies with ligands for the Toll-like receptors 7 and 9. // *Munich*. — 2008.
191. You H., Liu Y., Cong M. et al. HBV genes induce cytotoxic T-lymphocyte response upon adeno-associated virus (AAV) vector delivery into dendritic cells. // *Journal of viral hepatitis*. — 2006. — Vol. 13. №9. — P. 605–12.
192. Yuan C.H., Yang X.Q., Zhu C.L. et al. Interleukin-7 enhances the in vivo anti-tumor activity of tumor-reactive CD8⁺ T cells with induction of IFN-gamma in a murine breast cancer model. // *Asian Pac J Cancer Prev*. — 2014. — Vol. 15. — № 1. — P. 265–71.
193. Zehn D., Cohen C.J., Reiter Y. et al. Extended presentation of specific MHC-peptide complexes by mature dendritic cells compared to other types of antigen-presenting cells. // *Eur J Immunol*. — 2004. — Vol. 34. — P. 1551–1560.
194. Clinical Streptamers — IBA (Электронный ресурс). URL: http://www.iba-lifesciences.com/products_streptamer_Clinical_Streptamers.html.
195. DRKS — c (German Clinical Trials Register) (Электронный ресурс). URL: http://drks-neu.uniklinik-freiburg.de/drks_web/navigate.do?navigationId=trial.HTML&TRIAL_ID=DRKS00000205