

На правах рукописи



АЛРХМУН САЛЕХ

КЛОНИРОВАНИЕ TCR И ПОЛУЧЕНИЕ
HER2/NEU-СПЕЦИФИЧНЫХ TCR-T-КЛЕТОК С
ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКОЙ ИХ
АКТИВНОСТИ

1.5.3 – Молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ) и Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

Научный руководитель:

Сенников Сергей Витальевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ).

Официальные оппоненты:

Миронова Надежда Львовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН).

Денисов Евгений Владимирович, доктор биологических наук, профессор РАН, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией биологии опухолевой прогрессии научно-исследовательского института онкологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томский НИМЦ).

Аутеншлюс Александр Исаевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ).

Защита диссертации состоится « 03 » июля 2026 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: проспект Академика Лаврентьева, 8, Новосибирск.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИХБФМ СО РАН и на сайте ИАС www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « ___ » _____ 2026 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
кандидат химических наук


Пестряков П. Е.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Рак остаётся одной из ведущих причин смертности во всём мире: в 2020 году от него умерло более 10 миллионов человек, что делает рак второй по значимости причиной летальных исходов после сердечно-сосудистых заболеваний. Высокая гетерогенность опухолей, способность уклоняться от иммунного надзора и устойчивость к традиционным методам лечения подчёркивают необходимость разработки новых терапевтических стратегий. Хотя хирургия, химио- и лучевая терапия остаются основными методами лечения, они часто не обеспечивают длительной ремиссии при прогрессирующих и метастатических формах заболевания из-за системной токсичности, неспецифичности и появления резистентных субпопуляций опухолевых клеток.

На этом фоне иммунотерапия зарекомендовала себя как революционный подход, использующий возможности иммунной системы для избирательного уничтожения опухолевых клеток с потенциалом достижения долгосрочного контроля над заболеванием или даже его излечения. Среди наиболее перспективных стратегий - adoptивная Т-клеточная терапия, включающая выделение, модификацию и возврат пациенту Т-клеток с усиленной противоопухолевой активностью. Особый интерес представляет терапия с использованием Т-клеточных рецепторов (TCR-T), основанная на экспрессии в Т-клетках генетически модифицированных TCR, специфичных для опухоль-ассоциированных антигенов (ТАА) или опухоль-специфичных антигенов (TSA). В отличие от антител, TCR распознают внутриклеточные пептиды, представленные на опухолевых клетках молекулами человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA) класса I, что позволяет преодолевать механизмы резистентности, связанные с изменением или потерей поверхностных антигенов. Однако у онкологических больных эндогенные Т-клеточные ответы ослаблены из-за иммунной толерантности, истощения Т-клеток и иммуносупрессивного микроокружения опухоли (TME), богатого Т-регуляторными клетками (Treg), супрессорными клетками миелоидного происхождения и ингибирующими цитокинами.

Одной из ключевых мишеней для TCR-T клеточной терапии является рецептор эпидермального фактора роста человека 2 (HER2/neu), трансмембранная тирозин-киназа массой 185 кДа, повышение экспрессии которой наблюдается в 20–30% случаев рака молочной железы и при агрессивных формах рака желудка, яичников и эндометрия. HER2-позитивный рак молочной железы составляет 15–20% всех диагностированных случаев и характеризуется высокой пролиферацией, инвазивностью и ранним метастазированием, что коррелирует с неблагоприятным прогнозом. Современные методы лечения, такие как моноклональные антитела (Трастузумаб, Пертузумаб), ингибиторы тирозин-киназы (Лапатиниб) и конъюгаты антител с цитостатиком (Т-DM1), значительно улучшили выживаемость пациентов, однако у 25–30% пациентов развивается первичная или приобретённая резистентность в течение 1–2 лет, что приводит к рецидиву или метастазированию.

Настоящее исследование направлено на разработку протокола получения HER2-специфичных Т-клеток, нацеленных на эпитоп KIFGSLAFL (далее KIF, HER2 369–377), также известный как E75. Основной задачей является идентификация наиболее распространённых и функционально значимых TCR-

клонотипов с использованием высокоточного секвенирования мРНК единичных клеток на платформе BD Rhapsody, что позволяет выделить клонотипы с высоким аффинитетом к целевому антигену. Далее доминантный TCR клонировали в лентивирусный вектор для получения генномодифицированных TCR-T-клеток, которые проходят всестороннюю функциональную оценку, включая анализ цитотоксичности, способность к продукции ключевых цитокинов и транскриптомный профиль.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы является клонирование T-клеточного рецептора и получение генномодифицированных TCR-T-клеток, специфичных к опухолевому антигену HER2/neu, а также исследование их функциональных свойств, транскриптомного профиля и секрета *in vitro* и их терапевтического потенциала *in vivo*.

В ходе исследования были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработка технологии получения антиген-специфических T-лимфоцитов.
2. Клонирование и конструирование T-клеточных рецепторов, специфичных к антигену HER2/neu, с помощью секвенирования мРНК единичных клеток.
3. Разработка протокола лентивирусной трансдукции T-лимфоцитов генетической конструкцией, кодирующей разработанный TCR, и получение HER2/neu-специфичных генномодифицированных TCR-T-клеток.
4. Исследование функциональной активности, транскриптомного профиля и секрета полученных TCR-T-клеток *in vitro*.
5. Оценка терапевтического потенциала TCR-T-клеток *in vivo*.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработан протокол получения HER2/neu-специфичных T-лимфоцитов с последующей идентификацией и клонированием T-клеточных рецепторов на основе секвенирования мРНК единичных клеток, обеспечивающий выделение перспективных доминантных TCR-клонотипов для создания генномодифицированных TCR-T-клеток.
2. На основе доминантного TCR-клонотипа, специфичного к HER2/neu, создана лентивирусная конструкция третьего поколения, обеспечивающая эффективное получение HER2-специфичных TCR-T-клеток с уровнем трансдукции более 30% при сохранении жизнеспособности клеток свыше 95%.
3. HER2/neu-специфичные TCR-T-клетки демонстрируют антиген-специфичную цитотоксическую активность *in vitro* и формирование выраженного эффекторного профиля, подтверждённого анализом секрета и транскриптома.
4. В модели ксеногенной опухоли *in vivo* HER2/neu-специфичные TCR-T-клетки обеспечивают значимое подавление роста опухоли, что подтверждает терапевтический потенциал выбранного TCR-кандидата для дальнейшей клинической трансляции.

Научная новизна полученных результатов

Научная новизна исследования заключается в комплексном вкладе в развитие T-клеточной иммунотерапии HER2-положительных опухолей. Работа

внесла значительный вклад в разработку протоколов идентификации и генерации высокоаффинных HER2-специфичных TCR-T-клеток, расширяя возможности их применения. Ключевой инновацией стало создание эффективного протокола получения антиген-специфичных T-клеток, нацеленных на эпитоп HER2 KIFGSLAFL (HLA-A*02-рестриктированный), что обеспечило более чем 200-кратное увеличение популяции таких T-клеток *in vitro*.

Кроме высокой эффективности протокола, исследование продвинуло область T-клеточной иммунотерапии благодаря клонированию и молекулярному анализу HER2-специфичных TCR с использованием современных методов секвенирования мРНК единичных клеток для идентификации пар α - и β -цепей TCR из антиген-специфических клеток. Предложенный подход универсален и может быть адаптирован к различным антигенам и вариантам HLA, что расширяет его потенциал для фундаментальных исследований и для клинического применения.

Всесторонняя характеристика сконструированных TCR-T-клеток выявила их дифференцировку в CD4⁺CD8⁺ дубль-позитивные T-клетки с повышенной экспрессией генов эффекторных функций (GZMA, GZMB, PRF1, TNF- α). Функциональные тесты *in vitro* подтвердили антиген-специфическую цитотоксичность, при этом TCR-T-клетки избирательно уничтожали HER2-положительные линии SK-MEL-5 и SK-MEL-37, демонстрируя минимальное воздействие на клетки HCT-116 с умеренной экспрессией HER2 и на HER2-негативную линию MDA-MB-231, что свидетельствует о высокой специфичности и снижении риска неспецифической цитотоксической активности. Анализ секреции цитокинов показал значительное повышение уровней IL-2, гранзима B, TNF- α и IFN- γ , подтверждая мощную эффекторную активность. Модель *in vivo* на мышах SCID с HER2-положительными опухолями продемонстрировала значительное уменьшение объема опухоли (до 86%) с выраженным ингибирующим эффектом после 10-го дня терапии, что подчёркивает терапевтический потенциал разработанных TCR-T-клеток.

Практическая значимость

В работе внедрены инновационные методы, обладающие высоким трансляционным потенциалом. Разработанный протокол позволяет получать до 8,7% CD8⁺ HER2-специфичных T-клеток с чистотой до 68%, обеспечивая высокую производительность и возможность масштабирования для создания клеточных продуктов, пригодных для клинического использования.

Разработанные TCR-конструкции продемонстрировали выраженную цитотоксическую активность *in vitro* (до 70% лизиса опухолевых клеток) и значимую противоопухолевую эффективность *in vivo* (снижение объема опухоли до 86%), что подтверждает их терапевтический потенциал.

Предложенный подход характеризуется высокой гибкостью и масштабируемостью. Разработанный протокол позволяет идентифицировать 110 TCR-клонотипов, специфичных к антигену HER2, что обеспечивает формирование обширной библиотеки кандидатных рецепторов для последующей функциональной оценки. Такая глубина анализа существенно повышает вероятность выявления перспективных TCR-конструктов с оптимальным соотношением специфичности и функциональной активности.

Методология носит платформенный характер и может быть адаптирована для работы с другими опухоль-специфическими и опухоль-ассоциированными антигенами. В частности, замена пептида KIFGSLAFL на альтернативные эпитопы, включая NY-ESO-1 и MAGE-A3, позволяет получать широкую панель антиген-специфичных TCR, тем самым значительно расширяя терапевтический потенциал подхода.

Одним из ключевых достижений исследования стало получение патента на разработанный T-клеточный рецептор, что не только подтверждает его уникальность и инновационную ценность, но и значительно усиливает перспективы клинического применения, открывая путь к дальнейшему внедрению в медицинскую практику.

Методология и методы исследования

В работе применялись стандартные методы выделения мононуклеарных клеток периферической крови (МНК) с использованием центрифугирования в градиенте плотности фиколла-урографина, методы иммуномагнитной сортировки для получения CD8⁺ и CD3⁺ T-клеток, а также проточная цитометрия для подтверждения наличия аллеля HLA-A2 и оценки эффективности трансдукции. Для индукции антиген-специфичных T-лимфоцитов использовали культивирование дендритных клеток (ДК), полученных из прилипающей фракции МНК с применением GM-CSF и IL-4, с последующей нагрузкой пептидом KIF и индукцию созревания ДК с помощью TNF- α . Зрелые ДК совместно культивировали с предварительно стимулированными CD8⁺ T-клетками в присутствии IL-2, IL-7, IL-15 и антител к CD3/CD28. Обогащение KIF-специфичных T-клеток осуществляли с использованием тетрамеров Flex-T (PE/APC) с помощью флуоресцентно-активируемого клеточного сортинга.

Для клонирования T-клеточных рецепторов (TCR) применяли секвенирование мРНК единичных клеток (scRNA-seq) с использованием платформы BD Rhapsody и последующий анализ данных с помощью специализированного конвейера BD Rhapsody в сочетании с инструментом TCRscape для идентификации доминантных TCR-клонотипов и анализа их транскриптомных характеристик, что позволило выделить клеточные субпопуляции на основе их транскриптомного профиля. Отбор TCR-клонотипов усовершенствовали с использованием нейронной сети ERGO-II для прогнозирования вероятности связывания TCR с комплексом KIF-HLA-A*02. Конструирование лентивирусных векторов включало оптимизацию кодонов последовательностей TCR α и TCR β с помощью инструмента ExpOptimizer, сборку с использованием P2A-пептида и β -глобиновых UTR, а также упаковку в векторы третьего поколения с псевдотипированием VSV-G в клетках HEK293T.

Трансдукцию T-клеток проводили с определением оптимальной множественности инфекции (MOI) для достижения максимальной эффективности трансгенной экспрессии при минимальной цитотоксичности, при этом функциональный титр вируса оценивали с помощью qPCR. Функциональные свойства TCR-T-клеток оценивали с помощью цитотоксических тестов *in vitro* (метод определения лактатдегидрогеназы, LDH), анализа секретомы (мультиплексный иммуноанализ на базе микросфер LEGENDplex), а также транскриптомного анализа с помощью scRNA-seq. Оценка противоопухолевой

активности *in vivo* проводилась на моделях ксенотрансплантатов у мышей SCID с использованием измерения объема опухоли. Все эксперименты выполнялись в соответствии с утвержденными этическими протоколами.

Апробация работы и публикации

По материалам работы опубликовано 6 печатных работ в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных WoS и Scopus, а также получен 1 патент на изобретение в РФ. Результаты работы были представлены на 8 российских и международных конференциях.

Личный вклад соискателя

Представленные в работе экспериментальные данные были получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследования *in vitro* на базе лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ, включая планирование и проведение экспериментов, анализ данных, оформление и публикацию результатов. Автор принимал непосредственное участие в подготовке опухолевой клеточной линии и трансдуцированных Т-клеток для проведения *in vivo* экспериментов, которые проводились на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия).

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю работы, д.м.н., профессору С.В. Сеникову за глубокий анализ и профессиональные рекомендации при интерпретации данных исследования. Отдельная благодарность адресована коллективу лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ за содействие в освоении методов молекулярной иммунологии, практические советы, ценные замечания и неизменную поддержку на всех этапах реализации проекта.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы. Текст изложен на 130 страницах, иллюстрирован 22 рисунками, включает 2 таблицы, список литературы содержит 334 библиографических источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Разработка Т-клеточной терапии с использованием Т-клеточных рецепторов (TCR-T), нацеленной на эпитопы HER2/neu, представляет собой многообещающий подход для решения актуальных клинических задач, особенно при опухолях, резистентных к терапии. В следующих разделах представлены результаты оптимизации генерации антиген-специфичных Т-лимфоцитов, клонирования и конструирования HER2-специфичных TCR, трансдукции Т-клеток для получения HER2/neu-специфичных TCR-T-клеток, а также оценки их транскриптома и функциональных свойств *in vitro* и *in vivo* (рисунок 1).

1. Клонирование Т-клеточных рецепторов специфичных к эпитопу HER2

1.1. Разработка технологии получения антиген-специфических Т-лимфоцитов

После изучения литературы, в качестве мишени для активации Т-клеток с целью разработки эффективной иммунотерапии HER2-позитивного рака, был выбран HLA-A2- рестриктированный пептид KIFGSLAFL (сокращенно KIF, состоящий из аминокислот 369-377 белка HER2/neu). Этот пептид был выбран, так как представляет собой короткий пептид внеклеточного домена HER2/neu,

эффективно презентруемый молекулами HLA-A2, наиболее распространенного генотипа класса I HLA в популяциях человека, что подтверждено популяционными исследованиями, и делает его лучшим выбором для лечения, которое могло бы помочь большому количеству пациентов. Высокая иммуногенность пептида KIF, продемонстрированная его способностью вызывать сильные цитотоксические реакции Т-лимфоцитов *in vitro* и эффективно подавлять рост опухоли *in vivo*, дополнительно обосновала его выбор в качестве мишени для распознавания HER2-позитивных раковых клеток иммунной системой.

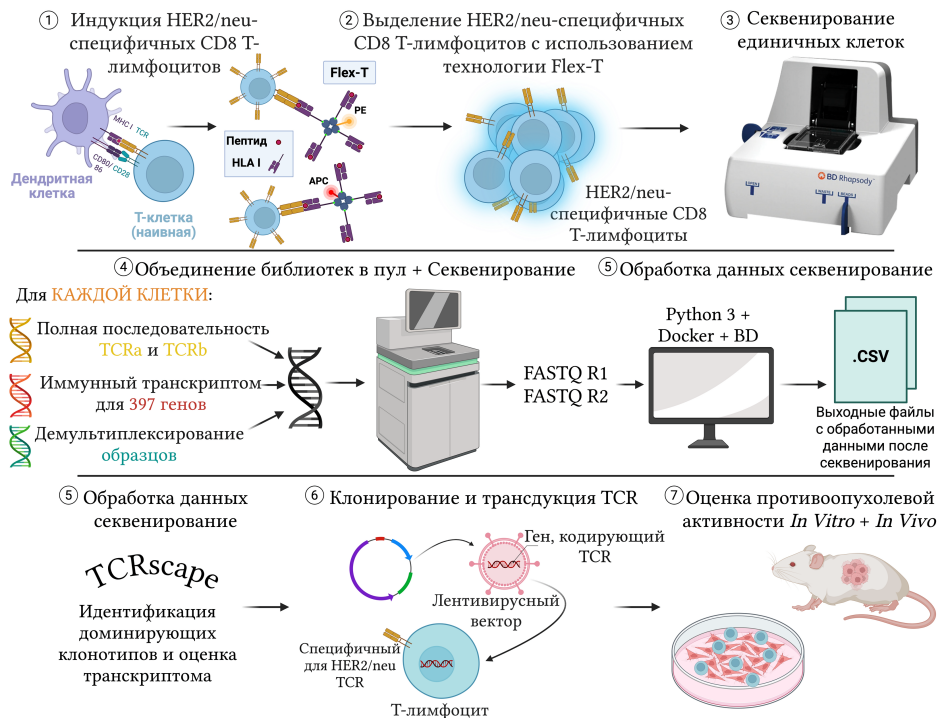


Рисунок 1. Общая схема ключевых этапов работы.

Исследование начали с привлечения шести здоровых доноров-добровольцев с подтвержденным методом проточной цитометрии наличием аллеля HLA-A2 (использованы антитела к человеческому HLA-A2). Мононуклеарные клетки периферической крови (МНК) выделяли из образцов крови методом центрифугирования в градиенте плотности фикола-урографина, что является стандартным подходом для получения высокоочищенных лимфоцитарных фракций. Учитывая низкую частоту KIF-специфических Т-клеток в естественном репертуаре, был разработан многоступенчатый протокол *in vitro* для их амплификации до детектируемых значимых количеств. Ключевым элементом протокола стало использование дендритных клеток (ДК), обладающих уникальной способностью процессировать и презентировать антигены посредством молекул HLA класса I и II, что обеспечивает активацию наивных Т-клеток и их клональную экспансию.

Зрелые ДК получали из прилипающей фракции МНК по оптимизированной методике (рисунок 2): клетки-предшественники культивировали в присутствии GM-CSF и IL-4 с последующей нагрузкой пептидом KIF и индукцией созревания TNF- α . Параллельно CD8+ Т-лимфоциты выделяли из неприлипающей фракции МНК методом отрицательной магнитной селекции (чистота >95%). Для повышения реактивности, клетки предварительно стимулировали IL-2, IL-7, IL-15, а также антителами к CD3 и CD28.

На следующем этапе зрелые ДК, нагруженные пептидом KIF, совместно культивировали с престоимированными CD8+ Т-клетками для активации антиген-специфических Т-клеток. После начальной антигенной стимуляции в культуру добавляли цитокины и костимулирующие антитела для поддержания пролиферации и жизнеспособности Т-клеток. После семи-восьми дней совместного культивирования мы использовали двухэтапный процесс выделения для обогащения KIF-специфичных Т-клеток. Сначала мы удаляли ДК с помощью отрицательной магнитной сепарации клеток CD8+, после чего проводили позитивную селекцию KIF-специфичных Т-клеток с помощью тетрамеров Flex-T, меченных флуорохромами PE и APC, с помощью проточного цитометрического сортировщика, что позволило получить популяцию Т-клеток высокой степени очистки. Затем отсортированные Т-клетки размножали *in vitro* в течение 14–21 суток в присутствии анти-CD3, анти-CD28 и цитокинового коктейля (IL-2, IL-7, IL-15), добываясь существенной клональной экспансии.

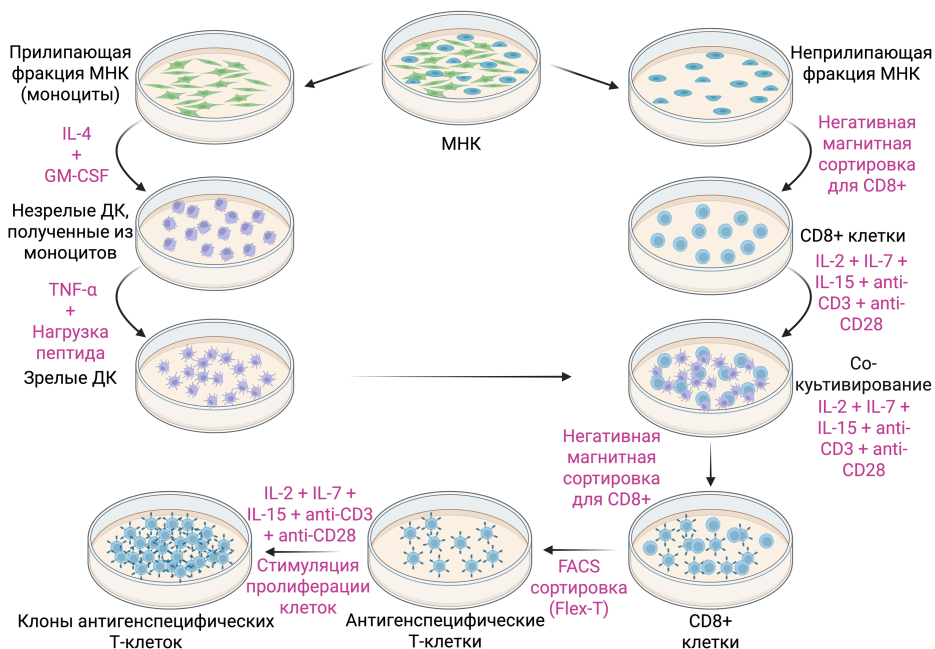
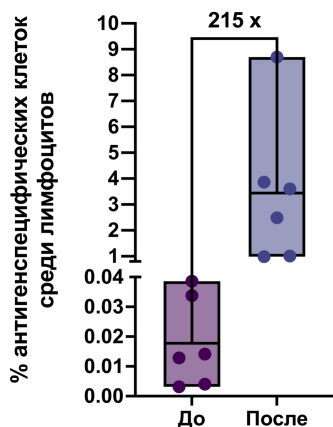


Рисунок 2. Схема разработанного протокола индукции антигенспецифических Т-цитотоксических лимфоцитов *in vitro*. МНК: мононуклеарные клетки периферической крови; ДК: дендритные клетки.

Разработанный протокол позволил увеличить долю KIF-специфичных Т-клеток в лимфоцитарной популяции более чем в 200 раз (рисунок 3). Конечный выход антиген-специфичных клеток варьировал среди доноров от 1,0% до 8,7% от общего пула лимфоцитов, что достаточно для эффективной сортировки. После процедуры чистота выделенных антиген-специфических клеток составляла 50–



68%, а их общее количество на донора 25 000 – 170 000 клеток, обеспечивая надежную основу для последующих этапов.

Таким образом, многоэтапный протокол (отбор доноров, генерация ДК, прайминг Т-клеток, антиген-специфическая селекция) позволил получить высокоочищенную популяцию HER2-специфичных Т-клеток.

Рисунок 3. Процентное содержание антиген-специфических Т-клеток среди лимфоцитов у доноров до и после применения протокола индукции (n = 6). Горизонтальная линия соответствует среднему значению.

1.2. Секвенирование мРНК единичных клеток и отбор клонотипов TCR

После получения HER2-специфичных Т-клеток было проведено секвенирование мРНК единичных клеток для идентификации и отбора клонотипов Т-клеточных рецепторов (TCR) с высокой специфичностью к пептиду KIF антигена HER2/пеп. Данный этап имел критическое значение для точного определения TCR, способных эффективно направлять Т-клетки к опухолевым клеткам, высокоэкспрессирующим HER2.

Исследование начали с анализа иммунного транскриптома и репертуара TCR 18 000 HER2-специфичных CD8⁺ Т-клеток, полученных в рамках разработанного протокола индукции. Единичные клетки загружали в специализированный картридж BD Rhapsody с последующим добавлением магнитных частиц с олиго(dT)-праймерами, комплементарными поли-А-хвостам мРНК, и образцов меток (Sample Tag) для мультиплексирования образцов, затем проводили лизис клеток для высвобождения внутриклеточного содержимого. Обратную транскрипцию проводили с использованием MMLV-ревертазы, обладающей терминальной трансферазной активностью, что позволило осуществить матрично-независимое присоединение остатков цитозина к 3'-концу растущей цепи кДНК. Это позволило осуществить гибридизацию с олигонуклеотидом переключения шаблона (Template Switch Oligo, TSO), содержащим остатки рибогуанина (rG), для последующего переключения матрицы. После этого выполняли второй раунд обратной транскрипции что позволило получить кДНК, содержащую универсальную последовательность TSO на 3'-конце, что, в свою очередь, облегчило амплификацию и секвенирование переменных регионов TCR (сайтов рекомбинации V(D)J).

Внедрение TSO обеспечило эффективный захват последовательностей, кодирующих переменные регионы TCR (сайты V(D)J-рекомбинации), расположенных на 5'-конце мРНК. Механизм захвата был реализован за счет

наличия в составе TSO специализированной поли(A)-последовательности, которая обеспечивала гибридизацию синтезированной молекулы кДНК с олиго(dT)-праймерами на поверхности магнитных частиц, образуя петлевую структуру. Последующее удлинение цепи с помощью фрагмента ДНК-полимеразы Klenow перевело генетическую информацию о вариабельных доменах TCR в двуцепочечную матрицу, пригодную для амплификации и секвенирования. Таким образом, использование технологии переключения шаблона позволило подготовить полноразмерные библиотеки для высокоточного секвенирования и идентификации клонотипов TCR.

Затем мы провели серию полимеразных цепных реакций (ПЦР) для амплификации TCR-последовательностей, целевой мРНК (используя панель из 397 генов, связанных с иммунитетом) и образцовых меток. Для обеспечения качества библиотек мы очистили продукты ПЦР в зависимости от размера ампликонов, используя магнитные шарики AMPure XP для удаления димеров праймеров и низкомолекулярных побочных продуктов. Этот этап повторяли после каждого цикла амплификации для удаления нежелательных фрагментов.

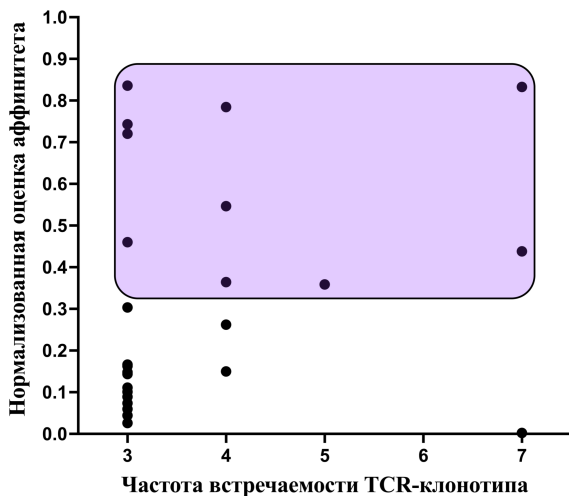
Критическим этапом подготовки библиотек TCR стало проведение случайного праймирования и удлинения (Random Priming and Extension, RPE). В отличие от стандартной таргетной ПЦР, использование случайных праймеров на данном этапе обеспечило равномерное покрытие всей длины вариабельных доменов TCR. Это позволило сохранить целостность генетической информации о α - и β -цепях и сделало возможной точную реконструкцию полноразмерных последовательностей при последующем секвенировании. Секвенирование охватило как полноразмерные последовательности TCR, так и транскриптомные профили отдельных клеток, что обеспечило оценку функционального профиля и антигенной специфичности каждой исследуемой клетки.

После секвенирования, полученные файлы FASTQ были обработаны с помощью конвейера BD Rhapsody, специализированного алгоритма для преобразования сырых данных в матрицу экспрессии генов. После фильтрации по качеству и коррекции ошибок (рекурсивная замена, алгоритмы на основе распределения) проанализировали 4989 клеток из мультиплексированных образцов (27,7% от исходной популяции). В результате идентифицировали 1429 уникальных клонотипов TCR, сформировав обширный набор данных для дальнейшего анализа. Высокий уровень детекции подтвердил эффективность протоколов подготовки библиотек, обеспечивших достаточное количество молекул для точного отбора.

Столь обширный и гетерогенный набор данных потребовал применения продвинутых алгоритмов для идентификации наиболее перспективных кандидатов. Во-первых, для оценки аффинности TCR к комплексу KIF-HLA-A*02 использовали нейросетевую модель ERGO-II (pEptide tcR matchinG predictiOn), современный инструмент, обученный на данных о взаимодействиях TCR с антигенами. В качестве референсной базы выбрали McPAS-TCR ресурс, содержащий >40 000 аннотированных TCR-последовательностей, ассоциированных с антигенами при патологиях, включая рак. В отличие от аналогов, предсказывающих специфичность только по CDR3 β , ERGO-II анализирует полный набор параметров: CDR3 α , CDR3 β , V/J-сегменты, пептид, тип HLA и тип T-клеток, что повышает точность прогноза.

Во-вторых, для проведения углубленного анализа идентифицированных клонотипов с учетом их транскриптомного профиля, мы использовали программный инструмент TCRscape, разработанный в нашей лаборатории. Необходимость применения данного инструмента была продиктована тем, что стандартный биоинформатический конвейер BD Rhapsody pipeline не обеспечивает автоматизированную интеграцию данных V(D)J-репертуара с результатами профилирования целевой панели генов на уровне единичных клеток. Более того, существующие решения не позволяют проводить эффективную идентификацию и сегрегацию доминантных клонотипов в привязке к их транскриптным характеристикам.

Интеграция показателей ERGO-II (шкала 0–1, где 1 максимальный предсказуемый аффинитет) с частотой клонотипов позволила больше усовершенствовать наш процесс отбора. Исключив низкорепрезентативные клонотипы (представленные в единичных клетках), мы сфокусировались на 110 клонотипах (7,7% от общего числа), обеспечив надежных кандидатов для дальнейшего анализа. Среди них выделили три клонотипа, каждый из которых экспрессирован в 7 клетках, что свидетельствует об антиген-зависимой клональной экспансии.



Клонотип с наивысшим показателем связывания ERGO-II отобрали в качестве ведущего кандидата для дальнейших исследований (рисунок 4).

Рисунок 4. Стратегия отбора перспективных TCR-кандидатов на основе частоты их встречаемости и прогностической оценки аффинитета. Выделенная область соответствует клонотипам, представляющим интерес для дальнейших исследований.

Для более глубокого анализа выбранного клонотипа, мы провели многомерную кластеризацию с помощью инструмента TCRscape, по частоте клонотипов, экспрессии ключевых генов (CD4 и CD8 маркеры Т-хелперных и цитотоксических Т-клеток соответственно, FOXP3 для регуляторных Т-клеток, NKG7 связанный с цитотоксической активностью, а также GZMA и GZMB, кодирующие гранзимы, участвующие в уничтожении клеток-мишеней) и показателей ERGO-II. Используя методы уменьшения размерности, мы идентифицировали четыре различных клеточных кластера, при этом клетки ведущего клонотипа, за исключением одной, плотно сгруппировались вместе. Эти клетки демонстрировали цитотоксический фенотип: CD8+, FOXP3-, NKG7+, GZMA+, GZMB+ (рисунок 5), что указывает на мощную эффекторную функцию, направленную на уничтожение опухолевых клеток. Это подтвердило

функциональную значимость выбранного клонотипа, приведя его молекулярный профиль в соответствие с желаемыми терапевтическими свойствами.

Таким образом, комбинация секвенирования единичных клеток, прогностического моделирования и функциональной кластеризации позволила выбрать ведущий клонотип TCR с высокой специфичностью и цитотоксическим потенциалом, заложив основу для разработки TCR-T-клеток против HER2-позитивного рака.

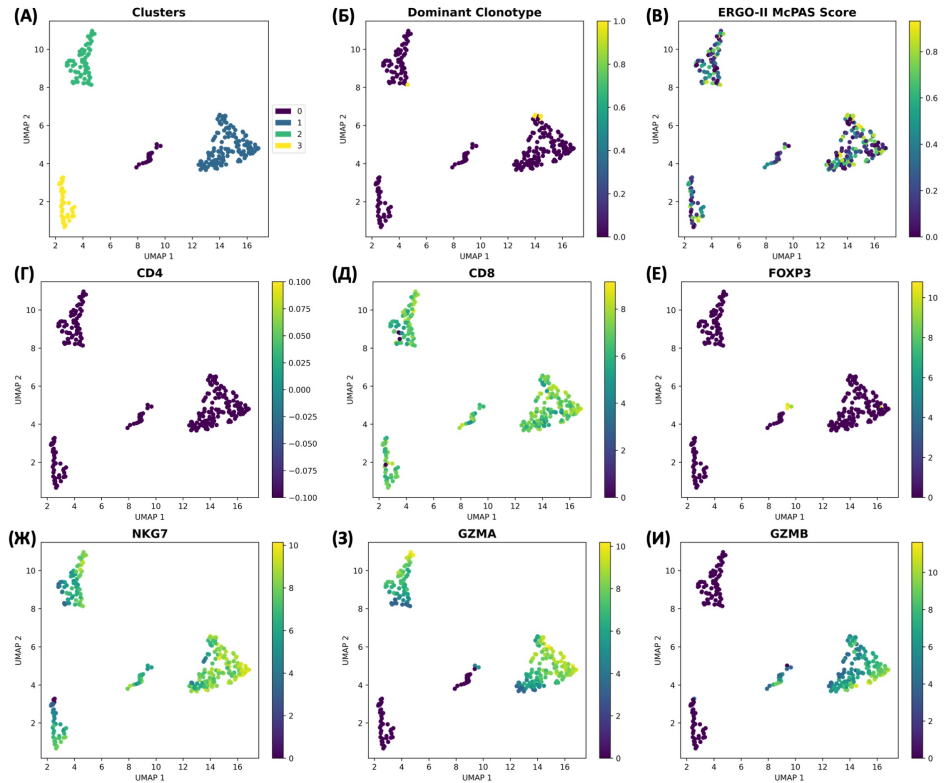


Рисунок 5. Анализ клонотипов и транскриптома антиген-специфических Т-клеток с использованием инструмента TCRscape: (А) Кластеры, идентифицированные методом HDBSCAN; (Б) Распределение клеток экспрессирующих доминантный клонотип; (В) Предсказанный аффинитет связывания (ERGO-II); (Ж-И) Уровни экспрессии маркерных генов (CD4, CD8, FOXP3, NKG7, GZMA и GZMB). Цветовая шкала: желтый максимальная экспрессия, фиолетовый минимальная.

2. Дизайн и конструирование плазмиды, кодирующей TCR, специфичный к эпитопу HER-2/neu

2.1. Дизайн плазмиды

В результате наших усилий по секвенированию единичных клеток мы идентифицировали последовательность ведущего клонотипа TCR, характеризующегося высоким аффинитетом связывания и распространенностью среди клонотипов. Чтобы сконструировать трансферную лентивирусную

плазмиду, кодирующую этот TCR, мы сначала оптимизировали последовательности альфа- (TCR α) и бета- (TCR β) цепей TCR, используя инструмент оптимизации кодонов ExpOptimizer. Этот веб-инструмент использует комплексный алгоритм, который регулирует использование кодонов в соответствии с трансляционным механизмом организма-хозяина повышая экспрессию генов за счет оптимизации эффективности транскрипции и трансляции и гарантируя, что вставка не содержит сайтов распознавания рестрикционных ферментов, используемых для лигирования вставки в плазмиду. Данная оптимизация была критически важна для устранения потенциальных ограничений на уровне трансляции, так как неоптимальное использование кодонов может приводить к снижению уровня экспрессии TCR и, как следствие, его функциональной активности и терапевтической эффективности.

Затем оптимизированные последовательности TCR α и TCR β были собраны в единую рамку считывания, разделив их саморасщепляющимся пептидом P2A, что обеспечило совместную экспрессию обеих цепей из единого транскрипта мРНК. Пептид P2A, функционирующий за счет механизма саморасщепления в процессе трансляции, позволяет независимо синтезировать α - и β -цепи TCR в эквимоллярных соотношениях, что важно для правильной сборки TCR. Кроме того, фланкирующие вставку 5'- и 3'-нетранслируемые области (UTR) гена β -глобина человека, известные своей способностью повышать стабильность мРНК и эффективность трансляции, были включены в конструкцию.

Трансферная лентивирусная плазида была сконструирована на основе плазмиды ВИЧ-1 pLenti hPGK GFP, выбранной за ее доказанную эффективность в доставке трансгенов со стабильной долговременной экспрессией. Мы заменили ген EGFP нашей вставкой TCR, используя ферменты рестрикции BamHI и BsrGI для обеспечения точного клонирования. Вставка была помещена под контроль промотора гена фосфолицераткиназы человека, обеспечивающего конститутивную экспрессию трансгена в гемопоэтических клетках.

2.2. Сборка и титрование вирусов

Трансферную лентивирусную плазмиду (кодирующую TCR), вместе с плазмидой, кодирующей VSV-G, и плазидами-упаковщиками лентивирусов третьего поколения (Gag-Pol и Rev) амплифицировали в клетках *Escherichia coli* DH5 α . Для подтверждения размера, идентичности и структурной целостности плазмид проводили рестрикционный анализ с последующим электрофорезом в агарозном геле.

В работе использована лентивирусная система третьего поколения, обладающая значительными преимуществами в плане безопасности и эффективности. Система разделяет компоненты лентивируса на четыре плазмиды: трансферная плазида, Gag-Pol, Rev и VSV-G, что минимизирует риск образования лентивируса, способного к репликации, благодаря необходимости множественных рекомбинационных событий между отдельными плазидами. Делеция U3-региона в длинных концевых повторах (LTR) создает самоинактивирующийся вектор, который подавляет активность вирусного промотора после интеграции, снижая риск инсерционного мутагенеза и повышая безопасность для клинического применения. Кроме того, система третьего поколения, основанная на белке Rev, экспрессируемом из отдельной плазмиды, обеспечивает эффективный ядерный

экспорт вирусной РНК, повышая эффективность упаковки и сводя к минимуму риск нежелательной активации гена. Эти особенности делают лентивирусы третьего поколения оптимальными для стабильной и безопасной доставки генов в неделящиеся клетки, такие как Т-лимфоциты. Плазида VSV-G кодирует гликопротеин G вируса везикулярного стоматита, формирующий псевдооболочку вируса с широким тропизмом. В отличие от нативной оболочки ВИЧ-1, VSV-G взаимодействует с рецепторами липопротеинов низкой плотности (LDLR), что обеспечивает эффективную трансдукцию различных типов клеток, включая человеческие Т-клетки.

Для производства лентивирусов использовали клетки HEK293Т, характеризующиеся высокой эффективностью трансфекции и оптимальными свойствами упаковки для лентивирусов. Трансфекцию проводили с использованием липофектамина 2000, а осаждение и концентрирование вируса проводили с помощью раствора TransLv™ Lentivirus Precipitation Solution (5×), основанного на полимерной преципитации, что позволяет увеличить титр вируса в 100 раз без применения ультрацентрифугирования.

Для количественного определения инфекционного титра мы использовали клетки HEK293Т в качестве мишени из-за их высокой восприимчивости к трансдукции. После выделения геномной ДНК из трансдуцированных клеток проводили количественную ПЦР для расчета титра. Метод позволяет измерять только биологически активные вирусные частицы, способные интегрировать транген TCR в геном хозяина, исключая дефектные вирионы. кПЦР-анализ детектирует интегрированную провирусную ДНК, обеспечивая прямое измерение успешных событий трансдукции, что критически важно для определения функционального титра.

3. Получение TCR-Т клеток специфичных к HER2/neu

3.1. Оптимизация MOI

Чтобы оптимизировать трансдукцию для терапевтического применения, мы провели пилотный эксперимент по определению оптимальной множественности инфекции (Multiplicity Of Infection (MOI)) для CD3+ Т-клеток, направленный на достижение максимальной эффективности трансдукции при сохранении жизнеспособности клеток, что является необходимым требованием для масштабирования и воспроизводимого производства TCR-Т-клеток. MOI, определяется как отношение количества инфекционных лентивирусных единиц к числу клеток-мишеней. Оптимизация MOI имеет решающее значение, поскольку позволяет сбалансировать количество вирусных частиц на клетку для достижения высокой эффективности трансдукции без ущерба для жизнеспособности или функциональности клеток. Низкий MOI может приводить к недостаточной экспрессии TCR и снижению терапевтической активности, тогда как чрезмерно высокий MOI способен вызывать множественную интеграцию провируса, цитотоксичность и нецелевые эффекты, нарушая жизнеспособность клеток.

В эксперименте CD3+ Т-клетки трансдуцировали при различных MOI с последующей оценкой жизнеспособности и эффективности трансдукции. Все протестированные MOI сохраняли жизнеспособность клеток на уровне >95%, однако эффективность трансдукции значительно варьировала. Наибольшая эффективность (30%) достигнута при MOI = 1, что обеспечило оптимальный баланс

между экспрессией TCR и сохранением здоровья клеток. Данный MOI был выбран для последующих экспериментов как основа для воспроизводимого получения HER2-специфичных TCR-T-клеток.

4. Функциональные и молекулярные характеристики генномодифицированных TCR-T-клеток

4.1. Оценка цитотоксичности *in vitro*

Для оценки способности TCR распознавать HER2 и опосредовать цитотоксичность был проведен анализ цитотоксичности *in vitro*. TCR-T-клетки совместно культивировали с линиями раковых клеток, экспрессирующими HER2/neu на разных уровнях, что подтверждено методом проточной цитометрии: SK-MEL-5 и SK-MEL-37, характеризующиеся высокой экспрессией HER2/neu, HCT-116, характеризующаяся умеренным уровнем экспрессии HER2/neu, а также линия MDA-MB-231, не экспрессирующая HER2/neu. Цитотоксичность оценивали по высвобождению лактатдегидрогеназы (ЛДГ), стабильного цитоплазматического фермента, выделяющегося в культуральную среду при повреждении клеточной мембраны в результате гибели клеток.

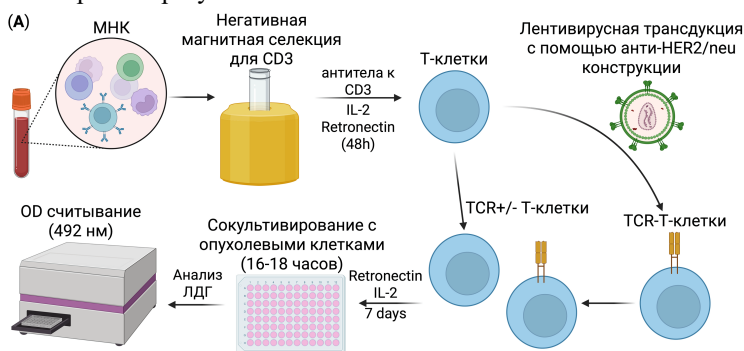
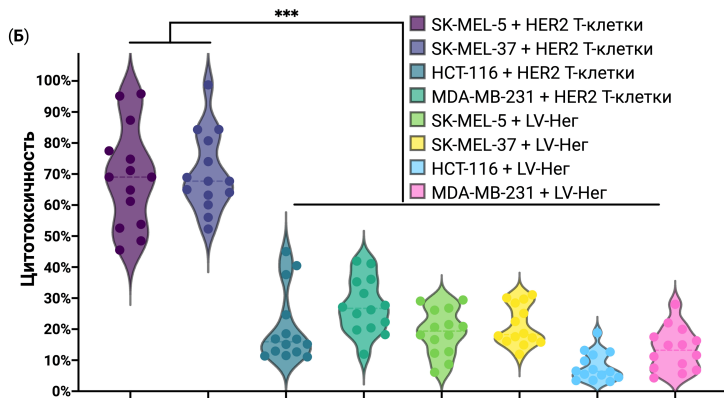


Рисунок 6. Анализ антиген-специфической цитотоксичности анти-HER2/neu TCR-T-клеток *in vitro*. (A)

Схематическое представление дизайна эксперимента. (Б) Процент гибели опухолевых



клеток в клеточных линиях с высокой экспрессией HER2/neu (SK-MEL-5 и SK-MEL-37), умеренным уровнем экспрессии HER2/neu (HCT-116) и отсутствием /минимальным уровнем

экспрессии HER2/neu (MDA-MB-231). LV-Нег: нетрансдуцированные Т-клетки. *** - скорректированное значение $p < 0,0005$. (n = 14; по 3 технических повтора на образец).

В эксперименте было показано, что анти-HER2/neu TCR-T-клетки индуцировали выраженный лизис клеток SK-MEL-5 ($69 \pm 16\%$) и SK-MEL-37 ($71 \pm 13\%$) по сравнению с HCT-116 ($21 \pm 12\%$), MDA-MB-231 ($27 \pm 9\%$). Для сравнения,

уровень лизиса при использовании нетрансдуцированных Т-клеток составил: ($19 \pm 7\%$) для SK-MEL-5, ($21 \pm 6\%$) для SK-MEL-37, ($8 \pm 5\%$) для HCT-116 и ($14 \pm 7\%$) для MDA-MB-23, (среднее \pm SD, $n = 14$, по 3 технических повтора) (рисунок 6).

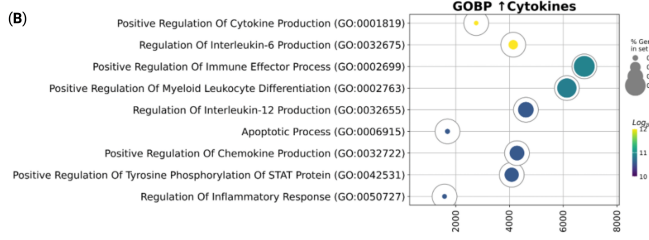
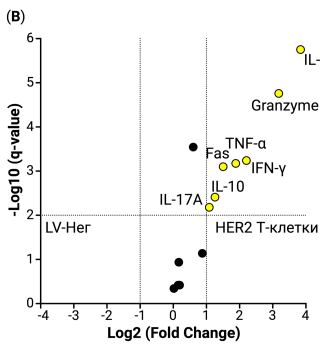
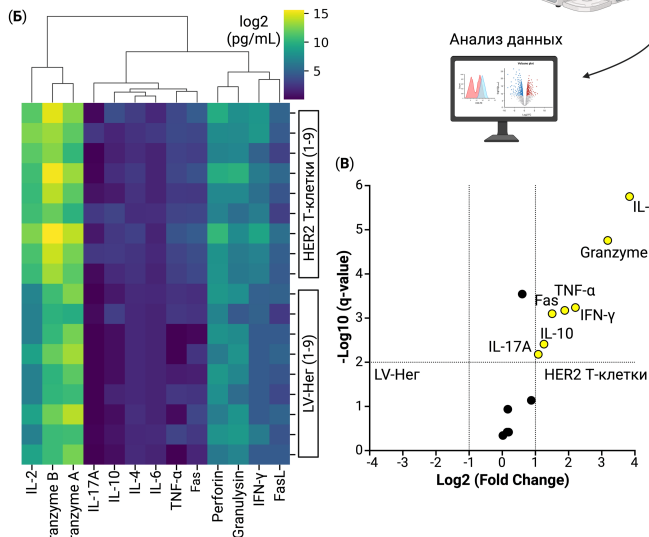
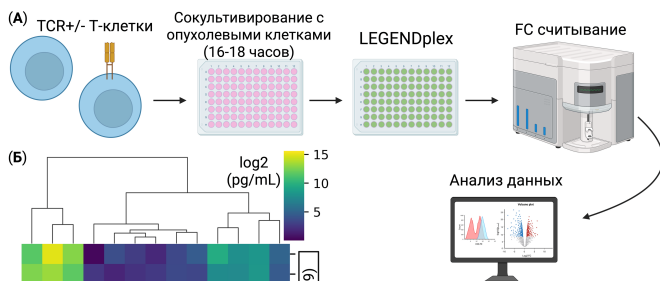
Выявленные различия были статистически значимыми: уровень специфического лизиса HER2-позитивных линий (SK-MEL-5 и SK-MEL-37) в 3,5 раза превышал показатели фоновой цитотоксичности нетрансдуцированных Т-клеток. При этом уровень гибели клеток с умеренным уровнем экспрессии HER2 (HCT-116) и HER2-негативных клеток (MDA-MB-231) оставался минимальным, что в среднем в 2,9 раза ниже, чем при гиперэкспрессии антигена. Эти данные подтверждают антиген-зависимый характер ответа и указывают на высокую селективность разработанного TCR в отношении HER2-гиперэкспрессирующих опухолевых клеток при минимальном воздействии на клетки с умеренным или отсутствующим уровнем экспрессии HER2. В совокупности полученные результаты подтверждают функциональную эффективность HER2-специфичных TCR-Т-клеток и обосновывают дальнейшее развитие данного подхода для терапии HER2-позитивных опухолей. Этот шаг имел решающее значение для подтверждения селективности и эффективности TCR, гарантируя его способность воздействовать на опухоли, гиперэкспрессирующие HER2, и в то же время щадить нормальные клетки с более низкой экспрессией антигена.

4.2. Анализ секретома

Следующим шагом было охарактеризовать функциональные свойства трансдуцированных TCR-Т-клеток. Основываясь на подтвержденных результатах по цитотоксичности *in vitro*, мы проанализировали секретом анти-HER2/neu TCR-Т-клеток, чтобы определить профиль высвобождения эффекторных молекул, ключевого показателя их антиген-специфической активации и противоопухолевого потенциала. Секретом анти-HER2/neu TCR-Т-клеток сравнивали с секретом нетрансдуцированных Т-клеток (LV-Her) с использованием мультиплексного профилирования цитокинов после стимуляции опухолевыми клетками. Анализ выявил значительное увеличение продукции ключевых эффекторных молекул в анти-HER2-TCR-Т-клетках по сравнению с контролем (рисунок 7 А, Б).

Результаты продемонстрировали многократное преимущество в секреции цитокинов генномодифицированными клетками. Наиболее выраженный рост наблюдался для интерлейкина-2 (IL-2), секреция которого увеличилась в 14 раза по сравнению с LV-Her контролем. Столь значительная продукция IL-2 указывает на формирование эффективных аутокринных и паракринных сигнальных путей, поддерживающих пролиферацию и выживаемость Т-клеток в опухолевой нише. Одновременное усиление выработки гранзима В (GZMB) (рост в 9 раз), сериновой протеазы, необходимой для индукции апоптоза и являющейся ключевым компонентом цитолитического аппарата, свидетельствует о высокой готовности TCR-Т-клеток к реализации цитотоксической функции и индукции апоптоза в HER2-позитивных клетках-мишенях. Кроме того, секреция IFN- γ и TNF- α возросла в 4,6 и 3,7 раза соответственно. Повышенные уровни этих цитокинов свидетельствуют о формировании мощного антиген-специфического ответа, направленного на прямую элиминацию опухоли и провоспалительную модуляцию иммунного микроокружения. В совокупности, кратное увеличение экспрессии всего спектра протестированных эффекторных молекул (от 3- до 14-раз)

подтверждает высокую специфичность разработанного продукта и его терапевтический потенциал.



круга соответствует доле генов в каждой категории от общего числа генов в базе GOBP.

Для выявления молекулярных механизмов, лежащих в основе функциональной активности TCR-T-клеток, проведен анализ обогащения набора генов (Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)) дифференциально экспрессируемых цитокинов (рисунок 7 B). GSEA выявил значительное обогащение биологических процессов (Gene Ontology Biological Process (GOBP)), включая синтез цитокинов, иммунные эффекторные функции, передачу сигналов хемокинов и STAT-опосредованную регуляцию транскрипции. Эти процессы объясняют усиленную цитотоксичность, активацию воспаления и модуляцию миелоидных клеток, что в совокупности определяет высокий секреторный профиль и противоопухолевую эффективность TCR-T-клеток.

4.3. Анализ транскриптома

Чтобы оценить молекулярные механизмы, участвующие в реализации противоопухолевого иммунного ответа, и определить пути цитотоксичности TCR-

Рисунок 7. Анализ секрета анти-HER2/neu TCR-T-клеток при совместном культивировании с опухолевыми клетками SK-MEL-37 (n = 9). (A) Схематическое представление дизайна эксперимента. (B) Тепловая карта секрета цитокинов. (B) Дифференциальный профиль секреции цитокинов анти-HER2/neu TCR-T-клетками (HER2 Т-клетки) и нетрансдуцированными Т-клетками (LV-Her контроль). (Г) Анализ обогащения биологических процессов на основе генов с повышенной экспрессией в анти-HER2/neu TCR-T-клетках. Цветовая шкала отражает уровень статистической значимости - максимальный, фиолетовый - минимальный, а размер

T-клеток при взаимодействии с HER2-экспрессирующими опухолевыми клетками (SK-MEL-37), мы провели секвенирование мРНК единичных клеток (scRNA-seq) с помощью панели BD Rhapsody™ Onco-BC HS. Это специализированная панель, нацеленная на ключевые опухоль-специфические и связанные с иммунитетом гены в TCR-T-клетках, позволяющая проводить точный анализ их цитотоксического и активационного состояния после совместного культивирования с опухолевыми клетками. scRNA-seq обеспечивает высокое разрешение для идентификации субпопуляций T-клеток, их состояний дифференцировки и молекулярных признаков активации и цитотоксичности. В отличие от обычного массового РНК-секвенирования, scRNA-seq фиксирует клеточную гетерогенность, выявляя редкие или переходные состояния, и точно определяет эффекторные пути, активируемые распознаванием антигена.

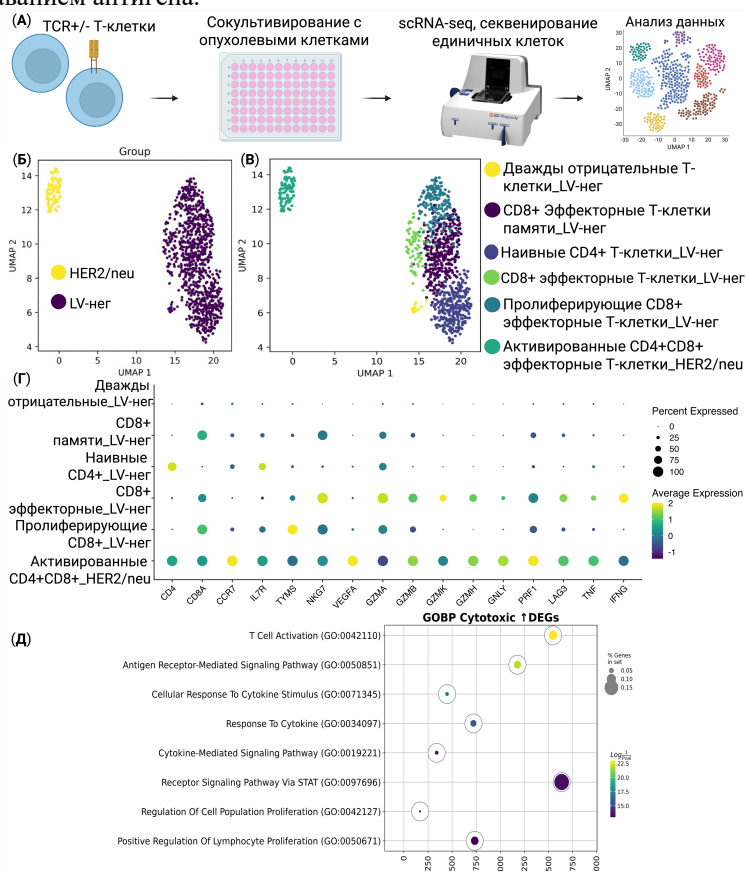


Рисунок 8. Транскриптомный анализ анти-HER2/neu TCR-T-клеток при совместном культивировании с опухолевыми клетками SK-MEL-37 (n = 4). (Б) UMAP-визуализация распределения Т-клеток по экспериментальным группам. (В) UMAP-визуализация клеточного состава и функциональных состояний Т-клеток. (Г) Точечный график экспрессии маркерных генов в отдельных кластерах Т-клеток. (Д) Анализ обогащения биологических процессов на основе дифференциально экспрессируемых генов при сравнении анти-HER2/neu TCR-T-клеток и CD8⁺ эффекторных Т-клеток из группы LV-нег.

Цветовая шкала отражает уровень статистической значимости: желтый - максимальный, фиолетовый - минимальный.

Анализ scRNA-seq показал, что все трансдуцированные Т-клетки дифференцировались в отдельную популяцию дважды положительных (CD4+CD8+) Т-клеток (рисунок 8 А, Б, В). Данная субпопуляция характеризуется усилением эффекторных функций, что в контексте иммунотерапии ассоциировано с более высокой противоопухолевой активностью. Эта популяция демонстрировала выраженный цитотоксический фенотип с повышенной экспрессией ключевых эффекторных молекул: гранзимов (GZMA, GZMB), гранулизина (GNLY), перфорины-1 (PRF1) и TNF- α (рисунок 8 Г). Повышенная экспрессия этих молекул указывает на мощный цитотоксический механизм, опосредованный перфорин-гранзимовыми путями (индукция апоптоза) и TNF- α -зависимыми воспалительными реакциями.

GSEA дифференциально экспрессируемых генов выявил обогащение путей, связанных с активацией Т-клеток (рисунок 8 Д), включая распознавание антигена, передачу сигналов TCR и костимулирующие пути. Отсутствие маркеров истощения (PDCD1, LAG3) в транскрипционном профиле подтверждает устойчивую эффекторную функцию, критически важную для терапии.

4.4. Оценка терапевтического потенциала TCR-Т-клеток *in vivo*

Чтобы оценить терапевтический потенциал TCR-Т-клеток *in vivo*, мы использовали модель опухоли на мышах SCID, которые характеризуются отсутствием функциональных Т- и В-клеток из-за мутации в гене *Prkdc*, которая приводит к остановке развития тимоцитов и нарушению адаптивного иммунитета при сохранении ограниченной активности врожденного иммунитета, включая NK-клетки и макрофаги. Такой иммунный профиль делает мышей SCID оптимальной моделью для ксенотрансплантации человеческих опухолевых клеток, обеспечивая возможность оценки эффективности TCR-Т-клеток в контролируемых условиях *in vivo*. Выраженный лимфоидный дефицит обеспечивает, что наблюдаемые противоопухолевые эффекты обусловлены преимущественно введенными трансдуцированными Т-клетками, тогда как сохраненные компоненты врожденного иммунитета в ограниченной степени способствуют воспроизведению опухолевого микроокружения. В этих условиях динамика объема опухоли служит прямым количественным показателем прогрессирования заболевания и позволяет оценить способность TCR-Т-клеток распознавать HER2/neu и реализовывать цитотоксический эффект *in vivo*.

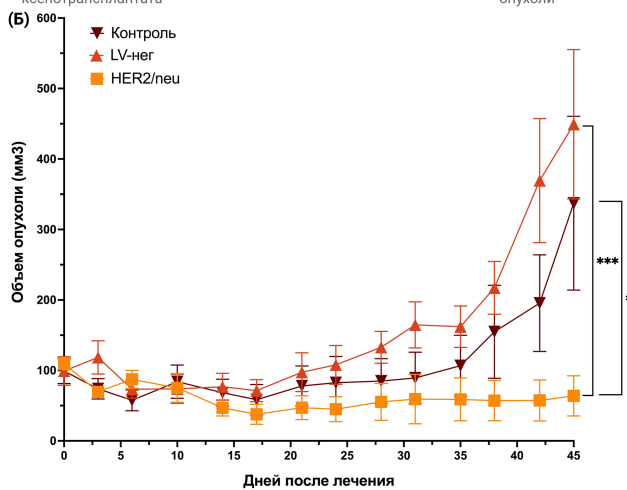
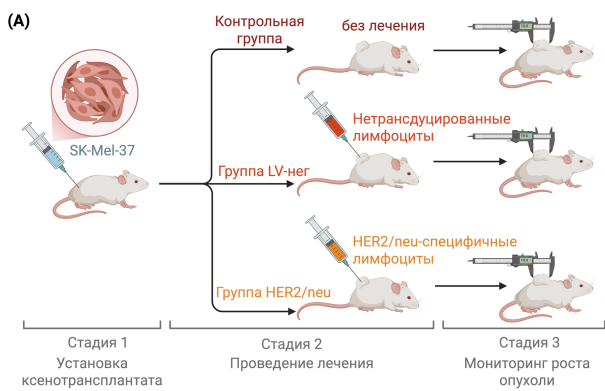
В качестве опухолевого материала применялись клетки SK-MEL-37 с повышенной экспрессией HER2/neu. После формирования опухолей мышей разделили на три группы, группа, получавшая лечение, получала анти-HER2/neu TCR-сконструированные Т-клетки (HER2/neu), контрольная группа, получавшая нетрансдуцированные Т-клетки (LV-нег), и контрольная группа, не получавшая лечения (Контроль). Анти-HER2/neu TCR-сконструированные Т-клетки (HER2/neu) и нетрансдуцированные Т-клетки (LV-нег) вводили однократно и локально в область сформированного опухолевого узла в объеме 50 мкл (10^7 клеток). Объем опухолей измеряли в течение 45 дней после начала терапии.

Результаты показали значительное подавление роста опухоли в группе лечения (HER2/neu) по сравнению с обеими контрольными группами. К 45-му дню в контрольной группе, не получавшей лечения (Контроль), наблюдалось быстрое

прогрессирование опухоли, со средним объемом опухоли приблизительно ~ 350 мм³, в то время как в группе, получавшей нетрансдуцированные Т-клетки (LV-нег), наблюдалась аналогичная динамика, достигающая среднего объема ~ 450 мм³.

В отличие от этого, в группе лечения (HER2/neu) объем опухоли сохранялся на низком уровне в течение всего периода наблюдения, при этом средний объем опухоли к 45-му дню составлял около 50 мм³. Данный показатель соответствует снижению объема опухоли на 86% и 81% по сравнению с группой (LV-нег) и контрольной группой (Контроль) соответственно, что представляет собой статистически значимое различие (рисунок 9).

Важно отметить, что у трех из восьми животных в группе HER2/neu к окончанию срока наблюдения была зафиксирована полная регрессия опухоли. Более того, существенное замедление роста новообразований в группе лечения наблюдалось уже после 10-го дня, что указывает на устойчивую противоопухолевую активность, обусловленную антиген-специфической цитотоксичностью TCR-Т-клеток. Такое заметное различие подчеркивает способность TCR-Т клеток эффективно воздействовать на HER2-экспрессирующие опухолевые клетки *in vivo*. Устойчивое подавление опухоли подтверждает специфичность и терапевтический потенциал TCR, обеспечивая прочную основу для дальнейшей доклинической и клинической разработки TCR-Т-терапии HER2-позитивных видов рака.



специфичность и терапевтический потенциал TCR, обеспечивая прочную основу для дальнейшей доклинической и клинической разработки TCR-Т-терапии HER2-позитивных видов рака. Рисунок 9. Оценка противоопухолевой эффективности анти-HER2/neu TCR-Т-клеток на ксенотрансплантатной модели *in vivo* по сравнению с необработанными контрольными (Контроль) и нетрансдуцированными Т-клетками (LV-нег) ($n = 8$). (А) Схематическое представление дизайна эксперимента. (Б) Динамика изменения объема опухоли в разных группах в течение 45 дней. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка (SE). * - скорректированное значение $p < 0,05$, *** - скорректированное значение $p < 0,0001$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этом исследовании представлена успешная разработка и доклиническая валидация Т-клеточной терапии на основе генномодифицированных Т-клеток с рецепторами, нацеленными на иммуногенный эпитоп HER2/neu, KIFGSLAFL (KIF) демонстрирующей значительный терапевтический потенциал в отношении HER2/neu-позитивных опухолей, особенно в случаях резистентности к терапии.

Разработанный протокол получения антиген-специфических Т-лимфоцитов обеспечил значительное обогащение KIF-специфичных клеток (более чем в 200 раз) с достаточным выходом для масштабируемого производства TCR-Т-клеток, пригодных для функционального применения.

Секвенирование мРНК единичных клеток позволило идентифицировать широкий репертуар TCR (110 различных клонотипов), из которого был выбран один доминантный клонотип для дальнейшей оценки. Процесс отбора был усовершенствован путем интеграции данных о доминантности клонотипов с прогнозируемыми показателями связывания TCR–KIF–HLA-A*02, рассчитанными с использованием модели глубокого обучения ERGO-II. Последующее клонирование и упаковка отобранного TCR в лентивирусные векторы третьего поколения обеспечили стабильное получение HER2/neu-специфичных TCR-Т-клеток при сохранении высокой жизнеспособности клеток.

Функциональная оценка показала, что полученные TCR-Т-клетки продемонстрировали высокую специфичность и антиген-зависимую активность. *In vitro* TCR-Т-клетки индуцировали эффективную цитотоксическую реакцию против опухолевых клеток с гиперэкспрессией HER2/neu (до 70% цитотоксичности в отношении опухолевых клеток SK-MEL-5 и SK-MEL-37), а *in vivo* демонстрировали значительное подавление роста опухоли.

Анализ секретома выявил повышенную выработку ключевых цитокинов и цитотоксических молекул, включая IL-2, гранзим В, TNF- α и IFN- γ , что указывает на мощные эффекторные реакции. Параллельное транскриптомное профилирование подтвердило активацию цитотоксических, иммунных и апоптотических путей, подчеркнув способность клеток к эффективному распознаванию HER2/neu и противоопухолевой активности. Примечательно, что дифференциация TCR-Т-клеток в дубль-позитивную (CD4⁺CD8⁺) популяцию с высоким уровнем экспрессии GZMA, GZMB, GNLY, PRF1 и TNF- α свидетельствует об усилении эффекторных функций, что коррелирует с их наблюдаемой терапевтической эффективностью. Эти результаты подчеркивают большой потенциал анти-HER2 TCR-Т-клеток в качестве таргетной иммунотерапии, способной обеспечить высокую специфичность при минимизации побочных эффектов.

Кроме того, разработанный протокол демонстрирует гибкость и адаптируемость так как он может быть применён к различным типам антигенов и вариантам HLA, что делает его универсальной и адаптируемой платформой как для фундаментальных исследований, так и для клинического применения. Такая универсальность расширяет его потенциальное применение за пределы HER2-позитивных злокачественных новообразований, открывая возможности для персонализированной иммунотерапии против широкого спектра опухоль-специфических или опухоль-ассоциированных антигенов.

В целом, результаты работы создают прочную научную и технологическую основу для дальнейшего развития анти-HER2/neu TCR-T-клеточной терапии и её трансляции в клинические исследования, особенно в случаях, резистентных к терапии. Тем не менее, будущие направления должны включать оценку длительной персистенции клеток *in vivo*, устойчивости их функциональной активности в иммуносупрессивном микроокружении, а также профили безопасности. Дополнительно перспективным является изучение комбинированных схем терапии, включая синергетические эффекты с препаратами, такими как Трастузумаб эмтансин (T-DM1), которые показали синергетический потенциал в клинических испытаниях, для повышения противоопухолевого действия и преодоления опухолевой гетерогенности.

Таким образом, результаты настоящего исследования подтверждают потенциал анти-HER2/neu TCR-T-клеток как клеточной иммунотерапии с высокой специфичностью и эффективностью, формируя основу для их дальнейшей клинической трансляции и одновременно подчёркивая необходимость продолжения исследований, направленных на оптимизацию терапевтической эффективности, преодоление опухолевой гетерогенности и совершенствование стратегий долговременной, безопасной и устойчивой TCR-T-клеточной терапии.

ВЫВОДЫ

1. Разработан оригинальный протокол для получения HER2/neu-специфичных Т-лимфоцитов, который позволил увеличить долю антиген-специфичных клеток более чем в 215 раз, обеспечивая платформу для получения антиген-специфичных Т-клеток.
2. С помощью секвенирования мРНК единичных клеток было идентифицировано 110 клонотипов Т-клеточных рецепторов, специфичных к HER2/neu, из них было отобрано 10 клонотипов с различным аффинитетом, которые представляют интерес для дальнейших исследований.
3. Определён доминантный TCR-клонотип, на основе которого создана лентивирусная конструкция третьего поколения, обеспечивающая эффективное получение HER2/neu-специфичных TCR-T-клеток с эффективностью трансдукции более 30% при сохранении жизнеспособности свыше 95%.
4. Подтверждена высокая цитотоксичность TCR-T-клеток против опухолевых клеток с высокой экспрессией HER2/neu, с минимальной активностью против клеток с умеренным уровнем экспрессии HER2/neu *in vitro*, что подтверждает их специфичность и терапевтический потенциал.
5. Анализ секрета анти-HER2/neu TCR-сконструированных Т-клеток при совместном культивировании с опухолевыми клетками SK-MEL-37 показал повышенную секрецию IL-2, гранзима В, TNF- α и IFN- γ . Транскриптомный анализ показал активацию путей цитотоксичности и активации иммунитета, а также повышенную экспрессию ключевых эффекторных цитотоксических молекул: гранзимов (GZMA, GZMB), гранулизина (GNLY), перфорина-1 (PRF1) и TNF- α .
6. Продемонстрирована противоопухолевая активность TCR-T-клеток в подавлении роста ксеногенной опухоли *in vivo* у мышей SCID, с выраженным ингибирующим эффектом после 10-го дня терапии, что подтверждает их высокий терапевтический потенциал.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Alrhmour Saleh**, and Sergey Sennikov. 2022. The Role of Tumor-Associated Antigen HER2/neu in Tumor Development and the Different Approaches for Using It in Treatment: Many Choices and Future Directions. *Cancers* 14, no. 24: 6173. <https://doi.org/10.3390/cancers14246173>
2. **Alrhmour Saleh**, Marina Fisher, Julia Lopatnikova, Olga Perik-Zavodskaja, Marina Volynets, Roman Perik-Zavodskii, Julia Shevchenko, Kirill Nazarov, Julia Philippova, Alaa Alsalloum, Vasily Kurilin1, Alexander Silkov, and Sergey Sennikov. 2024. Targeting Precision in Cancer Immunotherapy: Naturally-Occurring Antigen-Specific TCR Discovery with Single-Cell Sequencing. *Cancers* 16, no. 23: 4020. <https://doi.org/10.3390/cancers16234020>
3. Elena Golikova, Alina. Alshevskaya, **Alrhmour Saleh**, Natalia A. Sivitskaya, and Sergey Sennikov. 2024. TCR-T cell therapy: current development approaches, preclinical evaluation, and perspectives on regulatory challenges. *J Transl Med* 22, 897. <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05703-9>
4. Лопатникова Ю.А., Шевченко Ю.А., Филиппова Ю.Г., Фишер М.С., Облеухова И.А., Голикова Е.А., Корнеев А.А., Шаньгина П.А., **Алрхмур С.**, Перик-Заводский Р.Ю., Савостьянова Т.А., Курилин В.В., Сенников С.В. 2024. Технологии оценки антиген-специфических CD8⁺-лимфоцитов на основе мультимеров. *Иммунология*. 45 (6): 777-791. <https://doi.org/10.33029/1816-2134-2024-45-6-777-791>
5. Perik-Zavodskii R, Perik-Zavodskaja O, Volynets M, **Alrhmour S** and Sennikov S. 2025. TCRscape: a single-cell multi-omic TCR profiling toolkit. *Front. Bioinform.* 5:1641491. [doi: 10.3389/fbinf.2025.1641491](https://doi.org/10.3389/fbinf.2025.1641491)
6. **Alrhmour S**, Perik-Zavodskii R, Fisher M, Lopatnikova J, Perik-Zavodskaja O, Shevchenko J, Nazarov K, Philippova J, Kurilin V, Kichakova O, Zavjalov E, Golikova E, Timashev P, Glybochko P and Sennikov S. 2025. Anti-HER2/neu TCR-T Cells in Action: linking transcriptional signatures, secretomics, and In Vivo tumor suppression. *Front. Immunol.* 16:1646404. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1646404>
7. Сенников С.В., **Алрхмур С.**, Шевченко Ю.А., Перик-Заводский Р.Ю., Лопатникова Ю.А., Фишер М.С., Курилин В.В., Вольнец М.О., Перик-Заводская О.Ю., Назаров К.В., Силков А.Н. Патент на изобретение РФ №2856143. Способ получения Т-клеточного рецептора человека, способного распознавать эпитоп HER2/neu (ERBB2) (369-377, KIFGSLAFL) в комплексе с HLA-A*02. приоритет от 06.03.2025г, опубликовано 11.02.2026г., Бюл.№5. <https://www.fips.ru/cdfi/fips.dll/ru?ty=29&docid=2856143>

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФ № 21-65-00004