

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

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

На правах рукописи

**Алрхмун Салех**

**Клонирование TCR и получение HER2/неу-  
специфичных TCR-T-клеток с доклинической  
оценкой их активности**

**1.5.3 – Молекулярная биология**

**Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

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

**Новосибирск – 2026**

## Оглавление

Оглавление.....	2
Список сокращений и условных обозначений.....	4
Введение.....	6
Актуальность работы.....	6
Цель и задачи исследования.....	8
Основные положения, выносимые на защиту.....	8
Научная новизна работы.....	9
Теоретическая и практическая значимость работы.....	10
Методология и методы исследования.....	11
Апробация работы и публикации.....	12
Личный вклад соискателя.....	14
Объём и структура диссертации.....	14
Глава 1. Обзор литературы.....	15
1.1. HER2/neu.....	15
1.1.1. Значение HER2 как опухоль-ассоциированного антигена.....	16
1.1.2. Современные методы лечения, нацеленные на HER2, и их ограничения.....	20
1.2. Адоптивная Клеточная Терапия.....	26
1.2.1. Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (TILs).....	27
1.2.2. CAR-T-клетки.....	30
1.2.3. TCR-T-клетки.....	34
1.2.4. Другие виды адоптивной клеточной терапии.....	38
1.2.5. Почему TCR-T и TCR-подобная CAR-T терапия эффективны при HER2-позитивном раке	40
Глава 2. Экспериментальная часть.....	42
2.1. Материалы.....	42
2.1.1. Реактивы и препараты.....	42
2.1.2. Оборудование.....	44
2.1.3. Пластик.....	45
2.1.4. Программное обеспечение.....	45
2.1.5. Клеточные культуры.....	45
2.1.6. Лабораторные животные.....	46
2.2. Методы.....	47
2.2.1. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (МНК).....	47
2.2.2. Клональная экспансия HER2/neu-специфичных CD8 <sup>+</sup> лимфоцитов.....	47
2.2.3. Идентификация HER2-специфических TCR методом секвенирования мРНК единичных клеток.....	50
2.2.4. Клонирование TCR.....	55
2.2.5. Производство HER2/neu-специфичных TCR-T-клеток.....	59

2.2.6.	<i>Оценка цитотоксичности TCR-T-клеток in vitro</i> .....	60
2.2.7.	<i>Анализ транскриптома</i> .....	61
2.2.8.	<i>Анализ секрета</i> .....	62
2.2.9.	<i>Оценка терапевтического потенциала TCR-T-клеток in vivo</i> .....	62
<b>Глава 3. Результаты</b> .....		<b>64</b>
3.1.	<b>Клонирование T-клеточных рецепторов специфичных к эпитопу HER2</b> .....	<b>64</b>
3.1.1	<i>Разработка технологии получения антиген-специфических T-лимфоцитов</i> .....	64
3.1.2	<i>Секвенирование мРНК единичных клеток и отбор клонотипов TCR</i> .....	67
3.2.	<b>Дизайн и конструирование плазмиды, кодирующей TCR, специфичный к эпитопу HER-2/neu</b> .....	<b>74</b>
3.2.1	<i>Дизайн плазмиды</i> .....	74
3.2.2	<i>Сборка и титрование вирусов</i> .....	76
3.3.	<b>Получение TCR-T клеток специфичных к HER2/neu</b> .....	<b>77</b>
3.3.1	<i>Оптимизация MOI</i> .....	77
3.4.	<b>Функциональные и молекулярные характеристики генетически модифицированных TCR-T-клеток</b> .....	<b>78</b>
3.4.1	<i>Оценка цитотоксичности in vitro</i> .....	79
3.4.2	<i>Анализ секрета</i> .....	83
3.4.3	<i>Анализ транскриптома</i> .....	86
3.4.4	<i>Оценка терапевтического потенциала TCR-T-клеток in vivo</i> .....	88
<b>Глава 4. Обсуждение</b> .....		<b>92</b>
<b>Заключение</b> .....		<b>108</b>
<b>Выводы</b> .....		<b>111</b>
<b>Список цитированной литературы</b> .....		<b>112</b>

## Список сокращений и условных обозначений

- CD8 – Cluster of Differentiation 8, Кластер дифференциации 8
- CTL – Cytotoxic T Lymphocytes, цитотоксические Т-лимфоциты
- DC – Dendritic Cells, дендритные клетки
- ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, иммуноферментный анализ
- ERGO-II – Enhanced Recognition of TCR-peptide binding Optimization
- GM-CSF – Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- GNLY – Granulysin, гранулизин
- GZMA – Granzyme A, гранзим А
- GZMB – Granzyme B, гранзим В
- HCT-116 – Human colorectal carcinoma cell line, линия клеток карциномы толстой кишки человека
- HER2 – Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, рецептор эпидермального фактора роста человека 2
- HLA – Human Leukocyte Antigen, человеческий лейкоцитарный антиген
- IFN- $\gamma$  – Interferon-gamma, интерферон-гамма
- IL-2 – Interleukin-2, интерлейкин-2
- IL-4 – Interleukin-4, интерлейкин-4
- IL-7 – Interleukin-7, интерлейкин-7
- IL-15 – Interleukin-15, интерлейкин-15
- KIF – KIFGSLAFL, эпитоп HER2/neu (аминокислоты 369–377 антигена HER2), E75
- LDH – Lactate Dehydrogenase, лактатдегидрогеназа
- MDA-MB-231 – MD Anderson–Metastatic Breast–231, Human breast cancer cell line, линия клеток рака молочной железы человека
- MDSC – Myeloid-derived suppressor cells, супрессорные клетки миелоидного происхождения
- MOI – Multiplicity of Infection, Множественность инфекций
- P2A – 2A self-cleaving peptide, саморасщепляющийся пептид 2А
- PRF1 – Perforin-1, перфорин-1
- qPCR – quantitative Polymerase Chain Reaction, количественная полимеразная цепная реакция
- SCID – Severe Combined Immunodeficiency, тяжёлый комбинированный иммунодефицит
- scRNA-seq – single-cell RNA-sequencing, секвенирование РНК единичных клеток
- SK-MEL-5 – Sloan-Kettering Melanoma 5, Human melanoma cell line, линия клеток

меланомы человека

SK-MEL-37 – Sloan-Kettering Melanoma 37, Human melanoma cell line, линия клеток меланомы человека

TAA – Tumor-associated antigens, опухоль-ассоциированные антигены

TCR – T-cell Receptor, T-клеточный рецептор

TCR-T – T-cell Receptor-engineered T-cell, T-клетка с инженерным T-клеточным рецептором

TCR $\alpha$  – T-cell Receptor alpha chain, альфа-цепь T-клеточного рецептора

TCR $\beta$  – T-cell Receptor beta chain, бета-цепь T-клеточного рецептора

TME – Tumor Microenvironment, микроокружение опухоли

TNF- $\alpha$  – Tumor Necrosis Factor-alpha, фактор некроза опухоли-альфа

Treg – Regulatory T cells, регуляторные T-клетки

TSA – Tumor-specific antigens, опухоль-специфические антигены

UTR – Untranslated Region, нетранслируемая область

## Введение

### Актуальность работы

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 [1]. 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 [1–3].

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 [4]. Среди наиболее перспективных стратегий - адаптивная Т-клеточная терапия, включающая выделение, модификацию и возврат пациенту Т-клеток с усиленной противоопухолевой активностью [5].

Особый интерес представляет терапия с использованием Т-клеточных рецепторов (T Cell Receptor T cell therapy, TCR-T), основанная на экспрессии в Т-клетках генетически модифицированных TCR, специфичных для опухоль-ассоциированных антигенов (Tumor-associated antigens, TAA) или опухоль-специфичных антигенов (Tumor-specific antigens, TSA) [6]. В отличие от антител, TCR распознают внутриклеточные пептиды, представленные на опухолевых клетках молекулами человеческих лейкоцитарных антигенов (Human Leukocyte Antigens (HLA)) класса I, что позволяет преодолевать механизмы резистентности, связанные с изменением или потерей поверхностных антигенов [7]. Однако у онкологических больных эндогенные Т-клеточные ответы ослаблены из-за иммунной толерантности, истощения Т-клеток и иммуносупрессивного микроокружения опухоли (Tumor MicroEnvironment, TME), богатого Т-регуляторными клетками (Regulatory T cells, Treg), супрессорными клетками миелоидного происхождения (Myeloid-derived suppressor cells, MDSC) и ингибирующими цитокинами [8,9].

Одной из ключевых мишеней для TCR-T клеточной терапии является рецептор эпидермального фактора роста человека 2 (Human Epidermal growth factor Receptor 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 [10,11]. HER2-позитивный рак молочной железы составляет 15–20% всех диагностированных случаев и характеризуется высокой пролиферацией, инвазивностью и ранним метастазированием, что коррелирует с неблагоприятным прогнозом [12–14]. Современные методы лечения, такие как моноклональные антитела (Трастузумаб, Пертузумаб), ингибиторы тирозин-киназы (Лапатиниб) и конъюгаты антител с цитостатиком (Т-DM1), значительно улучшили выживаемость пациентов [15,16], однако у 25–30% пациентов развивается первичная или приобретённая резистентность в течение 1–2 лет, что приводит к рецидиву или метастазированию заболевания [11,17].

TCR-T клеточная терапия предлагает принципиально новый подход – использование Т-клеток, распознающих представленные на HLA внутриклеточные пептиды HER2, что позволяет устранить клетки, устойчивые к антитело-зависимой терапии. Эффективность такого подхода зависит от точной идентификации иммуногенных эпитопов HER2, создания высокоспецифичных TCR с безопасным профилем и оптимизации протоколов активации и размножения Т-клеток *ex vivo* [18–20]. Клинические исследования TCR-T терапии, включая HER2-таргетированные подходы, активно развиваются, что подтверждается регистрацией многочисленных клинических испытаний, направленных на оценку безопасности и эффективности таких методов у пациентов с HER2-положительными солидными опухолями [21].

В нашей лаборатории ранее был разработан протокол получения HER2-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов (Cytotoxic T Lymphocytes, CTL) с использованием аутологичных дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей эпитопы HER2, что продемонстрировало антиген-специфичную цитотоксичность *in vitro* [22]. Однако ограниченный репертуар эндогенных высокоаффинных TCR-клонотипов и их низкая частота в организме создают значительные ограничения для противоопухолевой функции, что подчеркивает необходимость использования генной инженерии для создания высокоаффинных, стабильных и функционально оптимизированных TCR-T-клеток, способных обеспечить более мощный и целенаправленный противоопухолевый ответ [23].

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 генетически модифицированных TCR-T-клеток, которые проходят всестороннюю функциональную оценку, включая анализ цитотоксичности, способность к продукции ключевых цитокинов и транскриптомный профиль.

Разработка и внедрение высокоэффективных HER2-специфичных TCR-T клеток, нацеленных к эпитопу KIFGSLAFL, открывает новые перспективы в преодолении ограничений традиционных методов иммунотерапии и расширяет арсенал эффективных стратегий для лечения HER2-положительных опухолей, включая формы заболевания, резистентные к стандартным препаратам.

### **Цель и задачи исследования**

**Целью** данной работы является клонирование T-клеточного рецептора, специфичного к эпитопу HER2/neu, получение генно-модифицированных TCR-T-клеток, специфичных к HER2/neu и исследование их функциональных свойств, а также транскриптомного профиля и секретома *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 генно-модифицированных TCR-T-клеток.
4. Исследование функциональной активности, транскриптомного профиля и секретома 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 генно-модифицированных 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 работы

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  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей TCR из антиген-специфических клеток. Предложенный подход универсален и может быть адаптирован к различным антигенам и вариантам HLA, что расширяет его потенциал как для фундаментальных исследований, так и для клинического применения.

Всесторонняя характеристика сконструированных TCR-T-клеток выявила их дифференцировку в CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> дубль-позитивные T-клетки с повышенной экспрессией генов эффекторных функций (GZMA, GZMB, PRF1, TNF- $\alpha$ ). 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 В, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ , подтверждая мощную эффекторную активность. Модель *in vivo* на мышах SCID с HER2-положительными опухолями продемонстрировала значительное уменьшение объёма опухоли (до 80%) на 10-й день после введения генномодифицированных клеток, что подчёркивает терапевтический потенциал разработанных TCR-T-клеток.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

### **Теоретическая значимость**

Исследование расширяет фундаментальные знания в области инженерии Т-клеточных рецепторов и биологии антигенспецифических Т-клеток. Разработанный протокол выделяется инновационным подходом к активации и экспансии Т-клеток, обеспечивая эффективную селекцию за счет многоэтапной стратегии культивирования. Применение секвенирования мРНК единичных клеток для идентификации последовательностей TCR позволило проанализировать широкий спектр кандидатных клонотипов и оценить их клональную представленность. Такой подход обеспечивает возможность рационального отбора доминирующих клонотипов с требуемым уровнем аффинности к целевому антигену при одновременном исключении клонотипов с потенциально повышенным риском перекрёстной реактивности. Это, в свою очередь, способствует повышению безопасности и терапевтической эффективности разрабатываемой TCR-T терапии.

### **Практическая значимость**

В работе внедрены инновационные методы, обладающие высоким трансляционным потенциалом. Разработанный протокол позволяет получать до 8,7% CD8+ HER2-специфичных Т-клеток (увеличение более чем в 200 раз) 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 объёма опухоли до 86% в экспериментальных моделях), 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.

Кроме того, стандартизация и воспроизводимость предложенного протокола создают предпосылки для оптимизации производственных процессов, сокращения сроков получения клеточного продукта и повышения технологической эффективности платформы.

Одним из ключевых достижений исследования стало получение патента на разработанный Т-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<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup> Т-клеток, а также проточная цитометрия для подтверждения наличия аллеля HLA-A2 и оценки эффективности трансдукции. Для индукции антиген-специфичных Т-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- $\alpha$ . Зрелые ДК совместно культивировали с предварительно стимулированными CD8<sup>+</sup> Т-клетками в присутствии IL-2, IL-7, IL-15 и антител к CD3/CD28. Обогащение KIF-специфичных Т-клеток осуществляли с использованием тетрамеров Flex-T (PE/APC) с помощью флуоресцентно активируемого клеточного сортирования.

Для клонирования Т-клеточных рецепторов (TCR) применяли секвенирование мРНК единичных клеток (Single-cell RNA sequencing, 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 $\alpha$  и TCR $\beta$  с помощью инструмента ExpOptimizer, сборку с использованием P2A-пептида и  $\beta$ -глобиновых UTR, а также упаковку в векторы третьего поколения с псевдотипированием VSV-G в клетках HEK293T.

Трансдукцию Т-клеток проводили с определением оптимальной множественности инфекции (Multiplicity Of Infection, MOI) для достижения максимальной эффективности трансгенной экспрессии при минимальной цитотоксичности, при этом функциональный титр вируса оценивали с помощью qPCR. Функциональные свойства TCR-Т-клеток оценивали с помощью цитотоксических тестов *in vitro* (метод определения лактатдегидрогеназы, ЛДГ), анализа секрета (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 диссертации опубликовано 6 печатных работ, а также получен 1 патент на изобретение в РФ:

1. **Alrhoun 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. **Alrhoun 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, **Alrhoun 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., **Алрхмун С.**, Перик-Заводский Р.Ю., Савостьянова Т.А., Курилин В.В., Сенников С.В. 2024. Технологии оценки антиген-специфических CD8<sup>+</sup>-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-Zavodskaia O, Volynets M, **Alrhoun 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. **Alrhoun S**, Perik-Zavodskii R, Fisher M, Lopatnikova J, Perik-Zavodskaia 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., **Алрхмун 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>

Результаты работ представлены на 7 российских и международных конференциях:

1. X и XI Международная Конференция Молодых Ученых OPENBIO (г. Новосибирск 2023 г и 2024 г).
2. Отчетной научно-практической конференции аспирантов НИИФКИ (г. Новосибирск, 2023 и 2024). (диплом I степени и диплом II степени).
3. 15-я Международная школа молодых ученых «Системная биология и биоинформатика» SBV-2024 (г. Новосибирск 2024). (диплом I степени).
4. 78-я Международная школа-конференция молодых ученых «БИОСИСТЕМЫ: организация, поведение, управление» (г. Нижний Новгород, 2025).
5. Всероссийский форум молодых исследователей ХимБиоSeasons (г. Калининград 2025). (диплом III степени).

## **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. Эксперименты *in vivo* на моделях ксенотрансплантатов выполнялись 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. Сенникову за глубокий анализ и профессиональные рекомендации при интерпретации данных исследования. Отдельная благодарность адресована коллективу лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ за содействие в освоении современных методов молекулярной иммунологии, практические советы, ценные замечания и неизменную поддержку на всех этапах реализации проекта.

## **Объём и структура 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.

# Глава 1. Обзор литературы

## 1.1. HER2/neu

Рецептор HER2 (также известный как HER2/neu, ErbB2 или CD340) представляет собой трансмембранную тирозин-киназу массой 185 кДа, кодируемую геном ERBB2, расположенным на хромосоме 17q12 [24–26]. В отличие от других членов семейства рецепторов эпидермального фактора роста (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR/ErbB), HER2 не имеет собственного лиганда и функционирует как предпочтительный партнер для димеризации с другими рецепторами, такими как HER1, HER3 и HER4 [27–29]. Эта димеризация активирует его тирозин-киназную активность, что приводит к фосфорилированию остатков тирозина и активации сигнальных каскадов, включая PI3K/АКТ и MAPK [30–32] (рисунок 1).

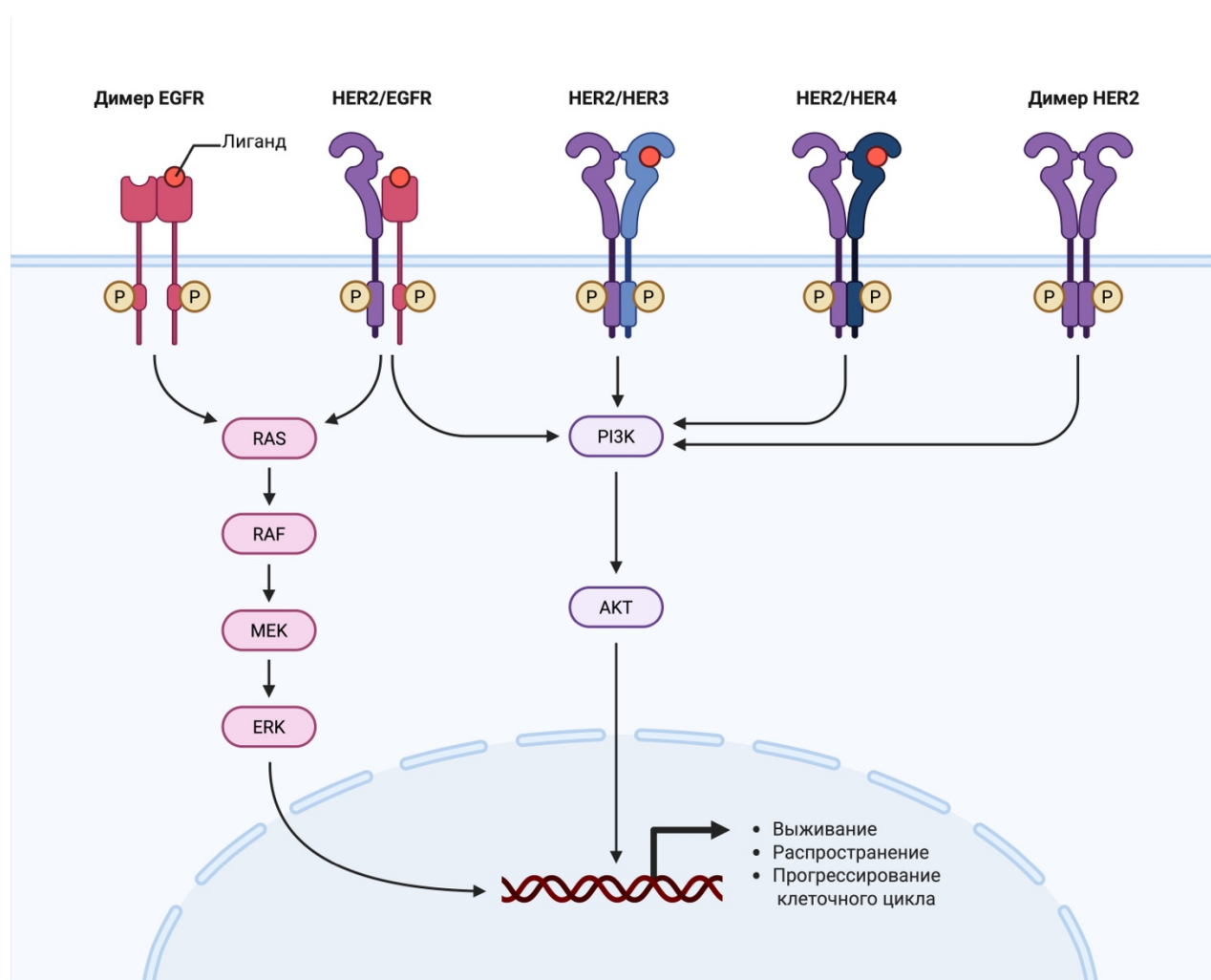


Рисунок 1. Структура димеризации и внутриклеточные сигнальные каскады рецепторов семейства EGFR.

HER2 играет ключевую роль в развитии и прогрессировании различных видов рака, особенно рака молочной железы, где HER2-положительный рак составляет около 15–20% всех случаев [10,11]. Повышенная экспрессия HER2 способствует усилению пролиферации, инвазии и метастазирования опухолевых клеток, что делает HER2-положительные виды рака особенно агрессивными [10,33–35]. До внедрения HER2-таргетной терапии такие виды рака характеризовались крайне неблагоприятным прогнозом, однако таргетная терапия произвела революцию в их лечении, значительно улучшив клинические исходы [36,37]. Исследования также показали, что высокие уровни рецептора HER2 коррелируют с улучшением выживаемости у пациентов с раком молочной железы, получающих HER2-направленную терапию, подчеркивая её терапевтическую значимость [38].

Хотя таргетная терапия с использованием Трастузумаба и Лапатиниба улучшила прогноз для пациентов с HER2-положительным раком, многие сталкиваются с первичной или приобретенной резистентностью, что ограничивает эффективность этих методов лечения [39–41]. Иммунотерапия, особенно терапия с использованием Т-клеточных рецепторов (TCR-T), предлагает перспективный подход к преодолению этих ограничений. TCR-T включает генетическую модификацию аутологичных Т-клеток для экспрессии TCR, способных распознавать специфические пептидные эпитопы HER2, представленные молекулами HLA на опухолевых клетках [6,22]. Это позволяет нацеливаться на внутриклеточные эпитопы HER2, которые недоступны для антител, и потенциально преодолевать механизмы резистентности, связанные с сигнальными путями HER2 [42]. Однако разработка эффективной TCR-T терапии сталкивается с несколькими вызовами, включая идентификацию иммуногенных эпитопов HER2, эффективное размножение антиген-специфичных Т-клеток *ex vivo* и создание TCR с оптимальной аффинностью и специфичностью для обеспечения надежной противоопухолевой активности без побочных эффектов [43–45].

В данном исследовании рассматриваются эти проблемы путем совершенствования протокола получения HER2-специфичных Т-клеток, нацеленных на эпитоп KIFGSLAFL, и клонирования высокоаффинных TCR для получения TCR-T-клеток, способных нейтрализовать HER2-позитивные опухоли.

### **1.1.1. Значение HER2 как опухоль-ассоциированного антигена**

Значимость рецептора HER2 в онкологии обусловлена его значительно повышенной экспрессией, достигающей 100–200-кратного увеличения в различных злокачественных

опухолях по сравнению с нормальной тканью [28,46,47]. Подобное повышение экспрессии ассоциируется с более агрессивным течением болезни, высоким риском метастазирования, частыми рецидивами и неблагоприятным прогнозом, что позволяет рассматривать HER2 как опухоль-ассоциированный антиген (ТАА), играющий ключевую роль в патогенезе рака [46,48]. Повышение экспрессия HER2 способствует его спонтанной гомо- или гетеродимеризации HER2 с другими членами семейства EGFR (HER1, HER3, HER4), что обеспечивает конститутивную активацию тирозин-киназного домена и запуск сигнальных каскадов, регулирующих пролиферацию, миграцию, инвазию и выживание опухолевых клеток [34,35]. Гетеродимеры HER2–HER3 являются наиболее онкогенными благодаря сочетанию мощной киназной активности HER2 и способности HER3 рекрутировать PI3K, усиливая пути выживания клеток [35,49,50]. Помимо прямого стимулирования пролиферации, HER2 способствует уклонению опухоли от иммунного надзора: он снижает экспрессию молекул HLA I и привлекает миелоидные супрессорные клетки (MDSC), создавая иммуносупрессивное микроокружение. Кроме того, HER2 усиливает экспрессию VEGF, стимулируя ангиогенез и обеспечивая сосудистое питание растущей опухоли [33,51].

Основным механизмом повышения экспрессии HER2 в опухолевых клетках является амплификация гена ERBB2 [12]; однако в ряде случаев её вызывают также активационные мутации [52,53] и нарушения транскрипционного или посттранскрипционного контроля, включая регуляцию микроРНК и влияние шаперонов HSP90, препятствующих убиквитин-зависимой деградации рецептора [27,54,55].

Иммуногенность HER2 подтверждена идентификацией пептидов E75 (HER2/neu 366–379, KIFGSLAFL) и GP2 (HER2/neu 654–662, IISAVVGIL), способных активировать CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты у HLA-A2<sup>+</sup> пациентов [56–58]. Однако низкий базовый уровень экспрессии HER2 в нормальных тканях [59], как эпителии лёгких, сердца и ЖКТ, предъявляет строгие требования к специфичности терапии и обуславливает необходимость применения высокоселективных подходов.

Хотя первое описание повышенной экспрессии HER2 было сделано при раке молочной железы и позднее подтверждено при раке желудка [60], повышение экспрессии HER2 также выявлялась при других онкологических нозологиях. Однако большинство предыдущих исследований сосредотачивались преимущественно на раке молочной железы и желудка, что, в сочетании с методологическими различиями, затрудняло проведение сравнительного анализа повышения экспрессия HER2 при различных онкологических формах [61]. Крупнейшее на сегодняшний день исследование Yап и др. обобщило

информацию более чем по 38 000 образцов из разных нозологиях [61] (таблица 1).

Таблица 1. Частота выявления антигена HER2-позитивности при различных нозологиях рака по данным иммуногистохимического (ImmunoHistoChemistry, ИHC) анализа.

Тип опухоли	Процент HER2-позитивных клеток (%), по данным Yan и др. [61]	Процент HER2-позитивных клеток (%), по данным других исследований
Рак мочевого пузыря	12.4	16 [62]
Рак пищевода и пищеводно-желудочного перехода	11.3	14.9 [63]
Рак молочной железы	10.5	18.3 [64]
Рак желчного пузыря	9.8	11.11 [65]
Холангиокарцинома (внепеченочная)	6.3	8.5 [66]
Аденокарцинома желудка	4.7	17.3 [67]
Рак шейки матки	3.9	1.5 [68]
Рак матки	3	6 [69]
Рак яичек	2.4	5–8 [70]
Колоректальный рак	1.8	2 [71]
Рак яичников (эпителиальный)	1.6	8.16 [72]
Рак головы и шеи	1.3	4–19 [73,74]
Рак легких (немелкоклеточный)	1.1	2.5 [75]
Злокачественные новообразования кишечника (мелкоклеточные)	0.9	3 [76]
Аденокарцинома поджелудочной железы	0.7	2 [77]
Холангиокарцинома (внутрипеченочная)	0.6	4 [78]
Рак предстательной железы	0.6	1.5 [79,80]
Гепатоцеллюлярные карциномы	0.4	0 [81]
Неэпителиальный рак яичников	0.4	7.69 [82]
Меланома	0.1	0 [83]
Стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта	0	0 [84]

Мультиформная глиобластома, глиомы высокой степени злокачественности	0	0 [85]
Рак почек	0	2.3 [86]
Рак легких (мелкоклеточный)	0	13 [87]
Меланомы (увеальные)	0	Не найдено*
Нейроэндокринные опухоли	0	0 [88]
Саркомы (перитонеальные и забрюшинные)	0	Не найдено*
Саркомы (мягких тканей)	0	8 [89]
Рак вилочковой железы	0	0 [90]
Рак щитовидной железы	0	0 [91]
Глиомы (низкой степени злокачественности)	0	7 [85]
Олигодендроглиомы	0	Не найдено*
Рак полового члена	0	0 [92]
Рак гипофиза	0	5 [93]
Одиночные фиброзные опухоли	0	Не найдено*
В целом	2.7	Не найдено*

\*не найдено (Никаких конкретных данных найдено не было)

Интересно, что амплификация гена HER2 и повышение экспрессии соответствующего белка наиболее часто выявляются при опухолях эпителиального происхождения. При этом большинство исследований, посвящённых HER2-таргетной терапии, сосредоточено на раке молочной железы и желудка. Согласно данным работы Yan и др., частота выявления HER2-положительных случаев при раке мочевого пузыря, желчного пузыря, внепечёночной холангиокарциноме, а также раке пищевода и пищеводно-желудочного перехода была относительно высокой по сравнению с раком молочной железы и желудка [61]. Это позволяет предположить, что данные нозологии также могут извлечь пользу из HER2-таргетной терапии, и их следует учитывать при планировании клинических исследований этих подходов.

В то же время важно учитывать, как отмечают сами авторы, что исследование имело определённые ограничения, в частности: риск смещения выборки, поскольку анализировались данные образцов, направленных в коммерческую лабораторию молекулярного профилирования, что могло способствовать преобладанию в выборке более

сложных и клинически неоднозначных случаев [61]. Тем не менее, это не снижает ценности проведённой работы, которая остаётся одним из наиболее полных и значимых исследований по данной теме.

### **1.1.2. Современные методы лечения, нацеленные на HER2, и их ограничения**

Как упоминалось ранее, повышение экспрессии HER2 ассоциируется с агрессивным течением заболевания, повышенным потенциалом метастазирования, более высокой частотой рецидивов и неблагоприятным прогнозом [10,33–35]. До появления HER2-таргетной терапии высокий уровень экспрессии белка HER2 рассматривался как плохой прогностический маркер. Однако внедрение таргетных методов лечения стало настоящей революцией в терапии рака молочной железы, значительно улучшив исходы у пациентов с HER2-позитивными опухолями [36,37], и теперь высокие уровни экспрессии рецептора HER2 ассоциируется с улучшенной выживаемостью больных, получающих терапию, направленную на HER2 рецептор [38].

За последние два десятилетия достигнут значительный прогресс в разработке методов лечения HER2-позитивного рака: в клиническую практику внедрено множество препаратов, воздействующих на этот рецептор, включая моноклональные антитела, ингибиторы тирозинкиназы, конъюгаты антитело–лекарственное средство, адоптивную Т-клеточную терапию и вакцины [48]. В настоящее время FDA одобрило несколько препаратов, направленных против HER2, значительная часть которых появилась в последние пять лет, включая три новых препарата, одобренных в 2020 году [94].

#### **Моноклональные антитела**

Внедрение пассивной иммунотерапии с использованием моноклональных антител (mAb), направленных против HER2, в сочетании с химиотерапией привело к значительному улучшению клинических исходов у пациентов, особенно при HER2-позитивном метастатическом раке молочной железы. Эти улучшения в основном связаны с подавлением онкогенных внутриклеточных сигналов, запускаемых HER2 [48]. Моноклональные антитела представляют собой менее токсичный подход по сравнению с традиционной цитостатической химиотерапией. Тем не менее, оставались опасения, связанные с применением mAb, направленных против опухоль-ассоциированных антигенов (ТАА), поскольку данные мишени могут экспрессироваться и на нормальных клетках, что потенциально вызывает различную степень токсичности из-за нарушения нормальной функции тканей. К счастью, клинические исследования показали, что моноклональные

антитела обладают благоприятным профилем безопасности и хорошо переносятся [95–97].

Ключевыми препаратами в лечении HER2-позитивного рака молочной железы являются Трастузумаб, Пертузумаб и Маргетуксимаб (рисунок 2), каждый из которых действует через различные механизмы подавления роста опухоли и улучшения выживаемости пациентов. Трастузумаб, представляющий собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1, стал первым препаратом против HER2, одобренным FDA в 1998 году для лечения метастатического рака молочной железы. Позже его применение распространилось на ранние стадии заболевания, при этом в некоторых исследованиях отмечалась высокая долгосрочная выживаемость пациентов [36,48,98,99]. Трастузумаб связывается с внеклеточным доменом HER2, нарушая передачу онкогенных сигналов, индуцирует антителозависимую клеточную цитотоксичность (Antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) за счёт привлечения NK-клеток и способствует апоптозу через механизмы ингибирования лиганднезависимой димеризации и усиления деградации HER2. Однако его эффективность ограничена кардиотоксичностью и развитием резистентности, часто связанной с компенсаторной регуляцией EGFR, что снижает эффективность у пациентов с очень высокой экспрессией HER2 [36,100–103].

Пертузумаб, полностью гуманизированное антитело, одобренное в 2012 году, связывается с другим эпитопом HER2, блокируя димеризацию с другими членами семейства HER. В отличие от Трастузумаба, Пертузумаб эффективно ингибирует лиганд-зависимую димеризацию HER2/HER3, что обеспечивает дополнительный противоопухолевый эффект [48,104]. Сочетание Пертузумаба и Трастузумаба демонстрирует синергизм, улучшая клинические исходы при метастатическом и неoadьювантном лечении [104–107]. В частности, исследование CLEOPATRA показало, что двойная блокада Трастузумабом и Пертузумабом увеличивает выживаемость без прогрессирования заболевания на 6,2 месяца у пациентов с метастатическим раком молочной железы [108].

Маргетуксимаб, химерное антитело, одобренное в 2020 году, нацелено на тот же эпитоп, что и Трастузумаб, но имеет модифицированную Fc-область, усиливающую ADCC. Эта модификация повышает связывание с активирующим рецептором FcγRIIIa (CD16A) на макрофагах и NK-клетках, одновременно снижая сродство к ингибирующему рецептору FcγRIIb (CD32B) [109,110]. Благодаря этому Маргетуксимаб эффективно устраняет пробелы в терапии, возникающие у пациентов с резистентностью к Трастузумабу или низкой экспрессией HER2, особенно в популяциях с полиморфизмом FcγRIIIa, и демонстрирует улучшенные результаты в сочетании с химиотерапией [109–112].

В совокупности эти антитела способствовали развитию HER2-таргетной терапии, расширяя её возможности и интегрируя иммуномодулирующие механизмы. Несмотря на достигнутый прогресс, резистентность остаётся серьёзной проблемой, у значительной доли пациентов она развивается уже в течение первого года лечения [113]. Механизмы резистентности включают экспрессию p95HER2, усечённой конститутивно активной формы, лишённой эпитопа для связывания Трастузумаба, а также активацию альтернативных путей сигнальной передачи, таких как PI3K/Akt и EGFR [114,115]. Кроме того, иммунное уклонение, например, снижение экспрессии HLA класса I, ограничивает эффективность ADCC и способствует снижению терапевтической активности антител [116].

### **Конъюгаты антител и лекарственных препаратов**

Основным недостатком традиционной химиотерапии является воздействие цитотоксических препаратов не только на опухолевые, но и на здоровые клетки, что ограничивает максимально допустимые дозы из-за токсичности [117]. Конъюгаты антитело–лекарственное средство (Antibody-drug conjugates, ADC) представляют собой перспективный класс терапевтических средств, обеспечивающий более широкое терапевтическое окно за счёт более целенаправленной и эффективной доставки цитотоксических агентов [118,119]. Для повышения селективности и минимизации повреждения нормальных тканей ADC используют высокоспецифичную целевую селективность моноклональных антител, которые доставляют цитотоксические компоненты исключительно к клеткам, экспрессирующим соответствующий антиген [118,120]. Особенно перспективным является применение ADC при HER2-позитивных опухолях, поскольку значительная часть таких опухолей характеризуется гетерогенностью экспрессии HER2 внутри опухоли. Проникающие цитотоксические компоненты ADC способны вызывать эффект стороннего наблюдателя, уничтожая соседние клетки с низкой или отсутствующей экспрессией HER2 [37,48,121].

Современные ADC, такие как Трастузумаб-Эмтансин (T-DM1), Трастузумаб-Дерукстекан (T-Dxd) и SYD985 (Трастузумаб-Дуокармазин) значительно расширили терапевтические возможности в лечении HER2-позитивного рака молочной железы, объединяя высокую специфичность Трастузумаба с мощным цитотоксическим действием (рисунок 2), что особенно важно для пациентов с метастатическими, резистентными или опухолями с низкой экспрессией HER2 [27,37,48,121–123].

T-DM1, одобренный FDA в 2013 году для лечения метастатического HER2-позитивного рака молочной железы и в 2019 году для адъювантной терапии после

неoadьювантного лечения, представляет собой конъюгат Трастузумаба с ингибитором микротрубочек DM1, связанным нерасщепляемым линкером. Для высвобождения цитотоксина требуется интернализация комплекса и лизосомальное расщепление. T-DM1 улучшил общую выживаемость на 6,8 месяцев у пациентов, резистентных к Трастузумабу, предложив целенаправленную альтернативу классической химиотерапии. Однако резистентность к T-DM1 может возникать из-за нарушений процессов интернализации, лизосомной деградации или усиления активности оттока лекарственного вещества. К наиболее распространённым побочным эффектам относятся анемия, тромбоцитопения и повышение уровней печёночных ферментов (АЛТ/АСТ) [27,48,124–126].

T-DXd, одобренный в 2019 году для лечения запущенного HER2-позитивного рака молочной железы после многократной предшествующей терапии, а также немелкоклеточного рака лёгких с мутацией HER2 и других солидных опухолей, представляет собой конъюгат с расщепляемым линкером и ингибитором топоизомеразы I (производным экзатекана). Этот механизм обеспечивает выраженный эффект стороннего наблюдателя, позволяющий воздействовать на клетки с низкой экспрессией HER2, а также опухоли, резистентные к T-DM1. Несмотря на схожие проблемы резистентности, T-DXd демонстрирует более короткий период полувыведения и потенциально снижает системную токсичность. Основные побочные эффекты включают гематологическую токсичность (анемию, нейтропению, лейкопению), пневмонит и интерстициальные заболевания лёгких, при этом периферическая невропатия развивается реже и в более лёгкой форме по сравнению с T-DM1 [37,48,122,125–127].

SYD985, ADC третьего поколения, представляет собой Трастузумаб с алкилирующим агентом дуокармицином, соединённые расщепляемым линкером, который позволяет эндосомальным протеазам высвобождать токсин, вызывающий необратимое алкилирование ДНК. Этот токсин эффективен как против делящихся, так и против неделящихся клеток, а также за счёт эффекта стороннего наблюдателя уничтожает соседние опухолевые клетки. Доклинические исследования показали, что SYD985 в 3–50 раз более цитотоксичен по сравнению с T-DM1 в клеточных линиях с низкой экспрессией HER2 и в моделях, устойчивых к T-DM1. Клинические испытания, включая исследование фазы 3 TULIP, продемонстрировали значительное улучшение выживаемости без прогрессирования и тенденцию к увеличению общей выживаемости у предварительно леченных пациентов с HER2-позитивным метастатическим раком молочной железы. SYD985 получил ускоренное одобрение FDA в 2018 году и разрешение на продажу в 2022 году. Основными побочными эффектами являются тошнота, повышенная утомляемость и нейтропения [37,48,121,128].

Таким образом, данные ADC значительно продвинули HER2-таргетную терапию, преодолевая резистентность и расширяя возможности лечения у различных групп пациентов за счёт инновационных цитотоксических механизмов. Вместе с тем разнообразие профилей побочных эффектов подчёркивает необходимость разработки индивидуальных терапевтических стратегий и дальнейших исследований для оптимизации безопасности и эффективности терапии.

### **Ингибиторы тирозин-киназы**

Помимо терапии моноклональными антителами, для таргетирования HER2 применяются низкомолекулярные ингибиторы тирозин-киназы (Tyrosine kinase inhibitors, TKI), которые конкурируют с АТФ за связывание с каталитическим доменом HER2, ингибируя его фосфорилирование и подавляя последующую передачу сигнала [122,129]. Разработка TKI была также стимулирована необходимостью средств, способных преодолевать гематоэнцефалический барьер для лечения метастазов в ЦНС, которые всё чаще диагностируются у пациентов с HER2-позитивным раком молочной железы, ранее получавших Трастузумаб или другие антитела [37,121]. Благодаря меньшей молекулярной массе TKI проникают через гематоэнцефалический барьер эффективнее, что теоретически делает их предпочтительными при лечении метастазов мозга. Дополнительные преимущества TKI включают пероральный путь введения и сниженный риск кардиотоксичности, что позволяет применять их у пациентов с застойной сердечной недостаточностью, развившейся после терапии Трастузумабом [27,122].

Лапатиниб, Нератиниб и Тукатиниб, ключевые TKI в лечении HER2-позитивного рака молочной железы, направленные на внутриклеточный киназный домен HER2 и способные эффективно блокировать онкогенную сигнализацию (рисунок 2), при этом обладая рядом преимуществ по сравнению с моноклональными антителами [27,37,48,122,129–132]. Лапатиниб, первый одобренный FDA в 2007 году TKI, обратимо ингибирует HER1 и HER2, замедляя рост опухоли и вызывая апоптоз, однако его использование при метастазах ограничено печёночной и сердечной токсичностью, а также резистентностью, связанной с мутациями PI3K [123,130,133]. Нератиниб, необратимый ингибитор второго поколения, одобренный в 2017 году, блокирует HER1, HER2 и HER4, способствует остановке клеточного цикла и деградации HER2, но его применение осложняется выраженной желудочно-кишечной токсичностью [123,130]. Тукатиниб, получивший одобрение в 2020 году, характеризуется высокой селективностью к HER2, сниженным числом побочных эффектов, связанных с EGFR, и способностью эффективно

проникать через гематоэнцефалический барьер, что делает его особенно эффективным в терапии метастазов мозга в комбинации с капецитабином и Трастузумабом [37,121,123,131,132].

Все три препарата применяются перорально и обладают меньшей кардиотоксичностью по сравнению с антителами, а также могут стимулировать противоопухолевый иммунитет. Однако проблемы резистентности и побочных эффектов требуют дальнейшей оптимизации терапевтических стратегий [48,122].

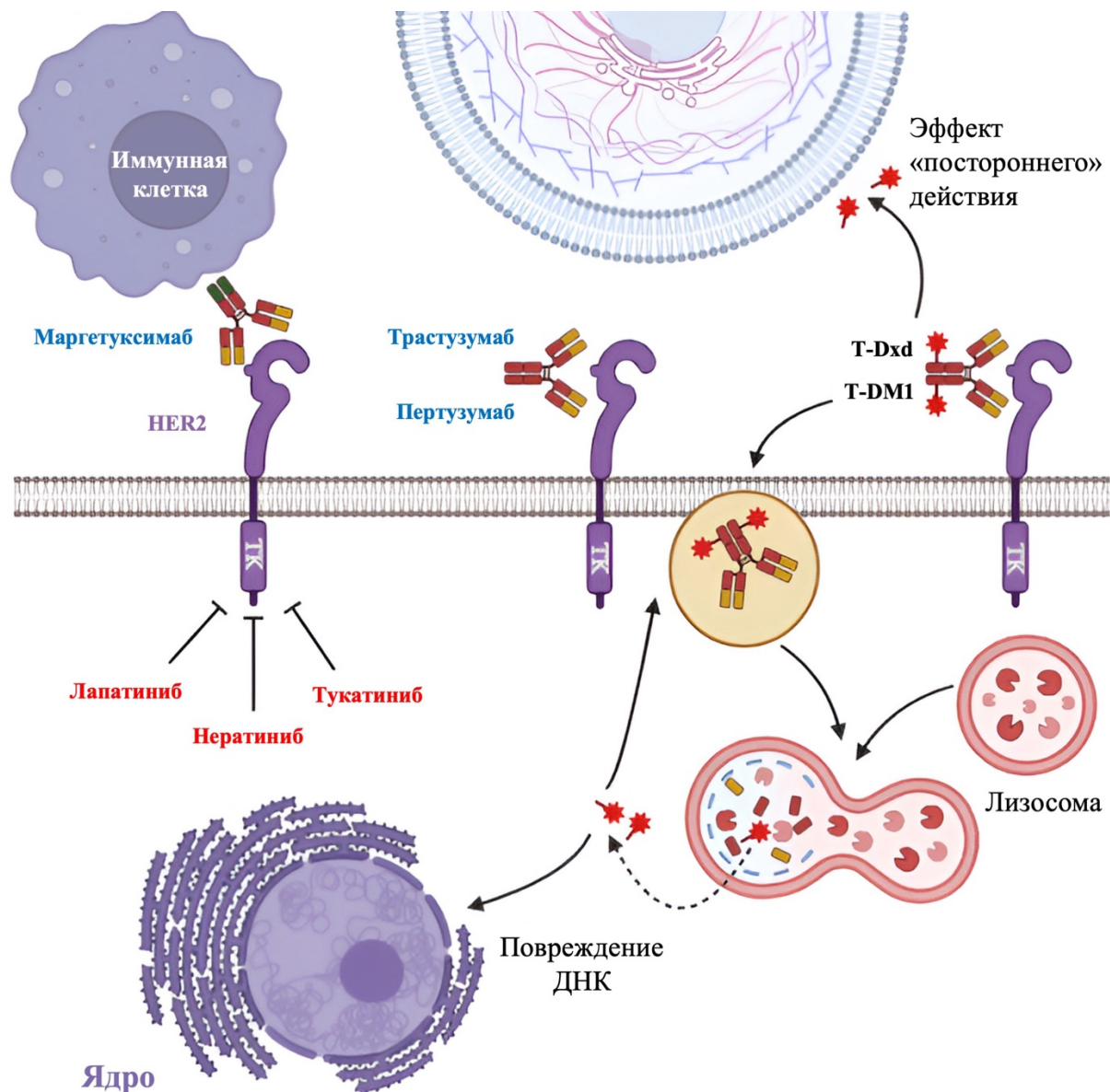


Рисунок 2. Основные терапевтические стратегии и механизмы действия препаратов, направленных на рецептор HER2.

## 1.2. Адоптивная Клеточная Терапия

Стратегии иммунотерапии HER2-экспрессирующих опухолей традиционно базировались на пассивной иммунотерапии с использованием HER2-блокирующих моноклональных антител (МАВ). Этот подход доказал свою эффективность при лечении HER2-позитивного рака молочной железы. Однако его долгосрочное применение ограничено механизмами резистентности, такими как отключение рецепторов, активация альтернативных сигнальных путей и подавление иммунного ответа, а также побочными эффектами, включая кардиотоксичность, недостаточное проникновение в труднодоступные области (например, метастазы в центральной нервной системе), аллергические реакции, отсутствие иммунологической памяти и частые рецидивы опухоли [28,39,113,134,135]. Эти ограничения подчеркивают необходимость развития инновационных подходов, таких как адоптивная клеточная терапия (Adoptive Cellular Therapy, АСТ), которая задействует адаптивный иммунитет, направленный на внутриклеточные эпитопы HER2, и способна обеспечивать длительные противоопухолевые ответы [136].

Вопрос о вкладе эндогенного Т-клеточного ответа в регрессию опухоли долго оставался спорным, так как опухоли часто развиваются несмотря на присутствие значительного числа циркулирующих или инфильтрирующих опухоль Т-клеток. Только в начале XXI века было продемонстрировано, что наличие внутриопухолевых Т-лимфоцитов коррелирует с благоприятным прогнозом [137]. Вдохновленные значительными успехами иммунотерапии рака за последнее десятилетие, такими как ингибиторы иммунных контрольных точек (ICI) и адоптивная клеточная терапия с использованием Т-клеток с химерными антигенными рецепторами (CAR-T), эти эффективные подходы начали активно применяться и при солидных опухолях [42,138].

Адоптивная клеточная терапия подразумевает выделение иммунных клеток пациента, их размножение, генетическую модификацию и/или активацию *ex vivo* с последующим возвратом обратно пациенту [139]. В основном используются Т-клетки, получаемые из опухоли или периферической крови, но также возможны другие иммунные клетки, например, естественные киллеры [5,140]. Целью терапии является преодоление иммунного подавления противоопухолевого ответа, с помощью увеличения количества опухоль-реактивных Т-клеток и усиления их противоопухолевой активности. Кроме того, АСТ обладает преимуществом как «живое лекарство» благодаря способности введенных клеток к размножению и выживанию *in vivo*, обеспечивая адаптивность и долгосрочную ремиссию [5,136,139,140].

Ключевые виды АСТ включают лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (Tumor-infiltrating lymphocytes, TILs), CAR-T-клетки и Т-клетки, сконструированные с использованием модифицированных Т-клеточных рецепторов (TCR-T). Эти методы предусматривают выделение Т-клеток (чаще всего лейкоферезом), их генетическую модификацию вирусными векторами (например, лентивирусным, ретровирусным) или невирусными методами (например, CRISPR/Cas9), последующее размножение *ex vivo* и инфузию пациенту, часто после лимфодеплеции для улучшения приживаемости введённых клеток [141].

### 1.2.1. Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (TILs)

Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (TILs), это гетерогенная популяция иммунных клеток, преимущественно CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-клеток, CD4<sup>+</sup> хелперных Т-клеток, а также иногда естественных киллеров (NK-клеток) и В-клеток. Эти клетки естественным образом проникают в микроокружение опухоли (ТМЕ) в ответ на опухолевые антигены. В отличие от CAR-T или TCR-T-клеток, требующих генной инженерии, TILs обладают природной опухолевой активностью, поскольку были активированы опухолевыми антигенами *in vivo* [142].

Терапия TIL предполагает извлечение этих клеток из опухолевой ткани, их размножение *ex vivo* и повторное введение пациенту для усиления противоопухолевого иммунного ответа [143] (рисунок 3). Процесс начинается с хирургической резекции или биопсии, после чего TIL выделяются посредством ферментативного расщепления или механической диссоциации [144]. Культивирование проводится с использованием интерлейкина-2 (IL-2) для стимуляции пролиферации и активации, часто с добавлением фидерных клеток или антител против CD3 [145]. Перед инфузией пациентам проводят лимфодеплецию (например, циклофосфамидом и флударабином) для снижения уровня иммуносупрессии и создания «пространства» для приживания TIL [146]. После инфузии назначается IL-2 для поддержки выживания и активности TIL, хотя это может вызывать серьезные токсические эффекты, включая синдром протечки капилляров [147].

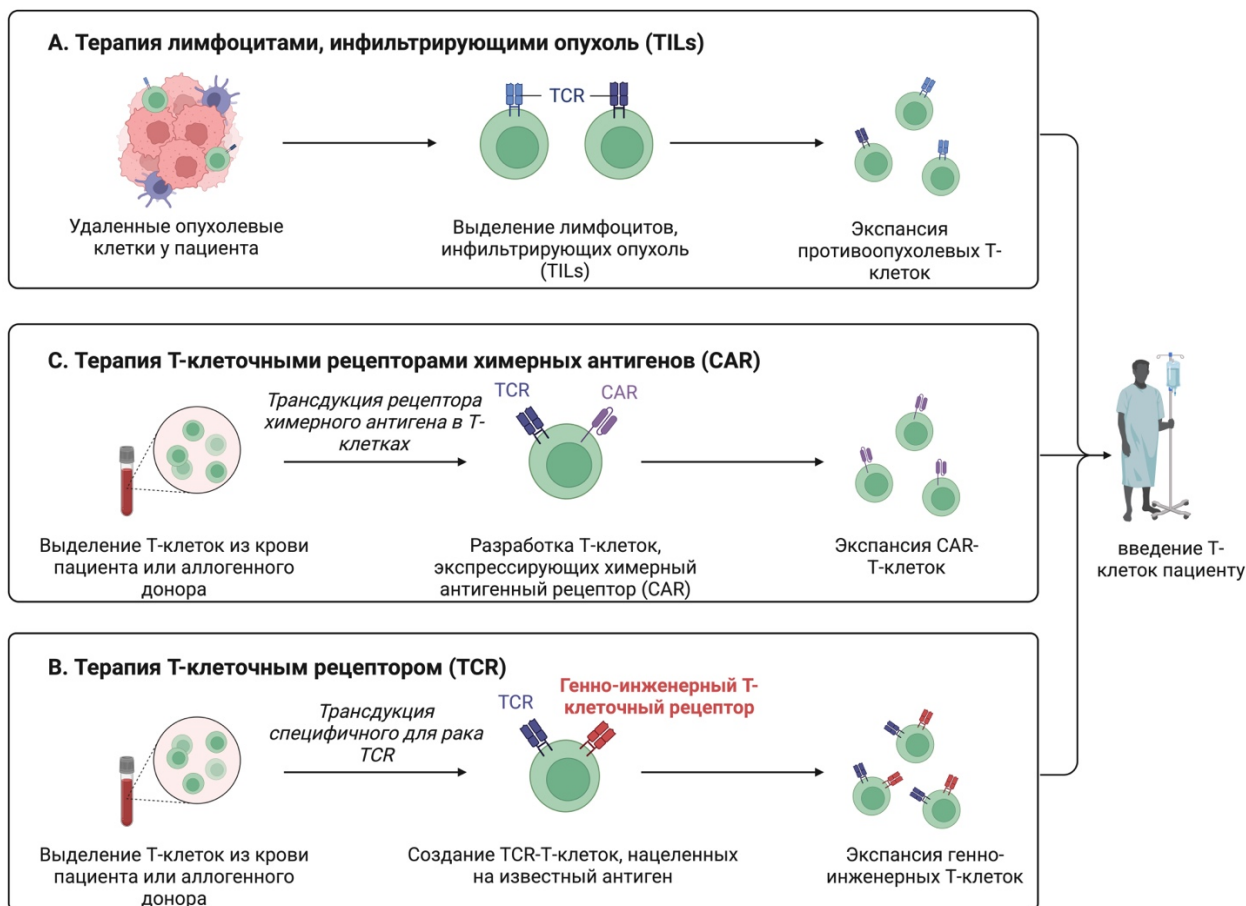


Рисунок 3. Основные стратегии адоптивной клеточной терапии генетически модифицированными Т-лимфоцитами и TILs.

Инфузированные TIL мигрируют к опухолевым очагам, распознают опухолевые антигены с помощью собственного TCR и осуществляют цитотоксическое действие через перфорин, гранзим и секрецию цитокинов (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) [148]. Поликлональная природа TIL позволяет им распознавать множество опухолевых антигенов, снижая риск ускользания опухоли из-за потери одного антигена, что является значительным преимуществом перед CAR-T и TCR-T, которые нацелены на одиночные мишени [149].

Терапия TIL была впервые предложена Стивеном А. Розенбергом в 1980-х годах. Первое клиническое исследование 1988 года показало эффективность TIL при метастатической меланоме с регрессией опухоли у более 50% пациентов [143]. В дальнейшем исследовании подтверждали высокий уровень объективного ответа и успешное применение у пациентов, резистентных к другим методам лечения [150,151]. Стандартизация протоколов и проведение исследований II и III фаз привели к одобрению FDA в 2024 году

терапии lifileucel для распространенной меланомы, что стало важной вехой в развитии адоптивной клеточной терапии [152].

Терапия TIL демонстрирует высокую эффективность при метастатической меланоме [147]. Успех связан с высокой мутационной нагрузкой меланомы и иммуногенным микроокружением опухоли [153]. Кроме того, TIL показывают обнадеживающие результаты при других солидных опухолях, таких как рак шейки матки и колоректальный рак с высокой микросателлитной нестабильностью [154,155].

При раке молочной железы, особенно тройном негативном (TNBC), высокий уровень TIL ассоциируется с улучшенным прогнозом и повышенной чувствительностью к химио- и иммунотерапии [156]. При HER2-позитивном раке потенциал TIL-терапии заключается в их способности распознавать различные опухолевые антигены, включая пептиды HER2. Высокий уровень стромальных TIL (sTIL) до лечения коррелирует с повышенной частотой патологического полного ответа (pCR) при неоадьювантной терапии с Трастузумабом [157]. В исследовании TRAIN-2 пациенты с высоким уровнем sTIL продемонстрировали улучшенные показатели безрецидивной выживаемости. Однако роль TIL при двойной HER2-блокаде (Трастузумаб + Пертузумаб) менее определена [158].

Доклинические модели показывают, что TIL могут распознавать пептиды HER2 (E75, GP2), представленные в комплексе с HLA, и проявлять цитотоксичность [159]. В ранних клинических испытаниях при HER2-положительном метастатическом раке молочной железы применение TIL с IL-2 показало стабилизацию заболевания у некоторых пациентов [160]. При этом высокая доля CD8+ Т-клеток в составе TIL связана с лучшими исходами, тогда как регуляторные Т-клетки (Treg) могут снижать эффективность [161]. TIL могут усиливать эффект HER2-таргетной терапии через антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) [162]. Также изучается комбинация TIL-терапии с ингибиторами контрольных точек (например, анти-PD-1) для преодоления иммунного подавления в микроокружении [163].

Тем не менее, TIL-терапия сталкивается с рядом ограничений. Для выделения достаточного количества TIL необходимы инвазивные процедуры (резекция или биопсия), которые не всегда возможны, особенно при метастазах в труднодоступных местах [164]. Гетерогенность TIL, разное соотношение цитотоксических и регуляторных подгрупп, а также вариабельность опухолевой антиген-специфичности приводят к разной эффективности терапии [165]. Иммуносупрессивное микроокружение, плотная строма и

наличие клеток-супрессоров (Treg, MDSCs) подавляют функцию TIL после инфузии, требуя комбинированных подходов [166].

Высокие дозы IL-2 вызывают тяжелые токсические эффекты, включая синдром протечки капилляров и полиорганную недостаточность, что особенно опасно для пациентов с кардиотоксической предисторией, например, после Трастузумаба [167]. Персонализированный и трудоемкий процесс производства TIL, требующий 4-8 недель культивирования в условиях GMP, а также высокая стоимость (100–200 тыс. долларов на пациента) и задержки в начале лечения ограничивают масштабируемость метода [146].

Клинические данные по TIL при HER2-позитивном раке молочной железы пока ограничены и показывают стабилизацию болезни у отдельных пациентов, без эффекта, сравнимого с меланомой [160]. Эти сложности подчеркивают необходимость дальнейших исследований для разработки неинвазивных методов получения TIL, обогащения опухолевых специфичных подгрупп, уменьшения иммунного подавления в микроокружении, снижения токсичности IL-2 и оптимизации производства с целью повышения доступности и эффективности терапии TIL для пациентов с HER2-позитивным раком молочной железы.

### 1.2.2. CAR-T-клетки

С открытием того, что внутриклеточной субъединицы CD3 $\zeta$  T-клеточного рецептора достаточно для передачи сигналов, способных активировать клетку, было предпринято множество попыток создать химерный антигенный рецептор (CAR) путём замены внеклеточных  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей TCR на одноцепочечный вариантный фрагмент иммуноглобулина (scFv). В отличие от TCR, внеклеточный домен распознавания антигена в CAR ковалентно связан с внутриклеточным доменом CD3 $\zeta$ . Конструкции CAR первого поколения продемонстрировали ограниченную активность *in vivo* из-за низкой персистенции T-клеток, что привело к добавлению одиночных (второго поколения) или множественных (третьего поколения) костимулирующих доменов (CD28, 4-1BB, OX40 и др.), которые усиливают эффективность и снижают истощение клеток, повышая тем самым их противоопухолевую активность (рисунок 4). Важно отметить, что молекулярный дизайн конструкции CAR существенно влияет на эффективность полученного клеточного продукта [5,42,140,168].

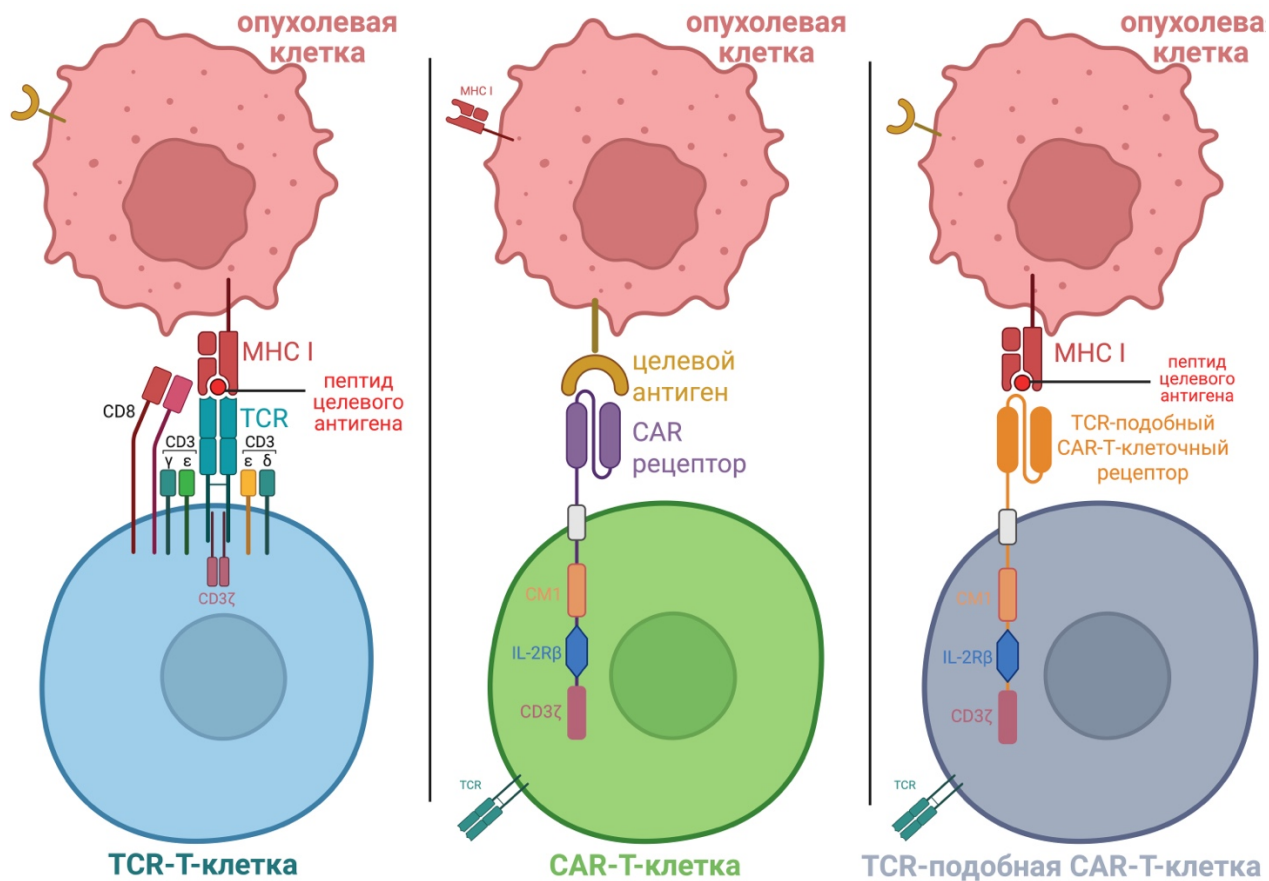


Рисунок 4. Сравнительная схема молекулярной организации и механизмов распознавания антигена TCR-, CAR- и TCR-подобными CAR-T-клетками.

Такая конструкция обеспечивает распознавание поверхностных антигенов независимо от MHC, обходя необходимость презентации антигена антигенпрезентирующими клетками (APC). Это делает CAR-T-клетки высокоэффективными против опухолей с равномерной экспрессией поверхностных антигенов [168]. Терапия CAR-T началась в 1989 году, когда Зелиг Эшхар разработал CAR первого поколения, нацеленные на CD8 [169]. К 1993 году Мишель Саделен из Memorial Sloan Kettering усовершенствовал CAR с добавлением костимулирующих доменов, таких как CD28, что повысило выживаемость и функциональность Т-клеток [170]. Первое клиническое исследование в 2002 году было направлено на CD19 при лимфоме, а последующие испытания в Университете Пенсильвании в 2006 году при лейкемии привели к значительным ремиссиям в 2010–2011 годах [171,172].

Процесс CAR-T-терапии начинается с лейкофереза, забора Т-клеток из периферической крови пациента (рисунок 3). Далее клетки трансдуцируются вирусным вектором, кодирующим конструкцию CAR, которая распознаёт специфический опухолевый антиген (например, внеклеточный домен HER2). scFv связывает антиген, активируя Т-клетки

через CD3 $\zeta$  и костимулирующие сигналы, что приводит к высвобождению цитокинов (IFN- $\gamma$ , IL-2), пролиферации и цитотоксической активности посредством выделения перфорина и гранзима [173]. После размножения *ex vivo* до терапевтических доз (обычно 10<sup>8</sup>–10<sup>9</sup> клеток) CAR-T-клетки вводятся обратно пациенту, как правило после проведения химиотерапии (флударабин, циклофосфамид), вызывающей лимфодеплецию, что снижает число иммуносупрессивных клеток и улучшает приживание [174]. После инфузии, CAR-T-клетки мигрируют к опухоли, распознают антиген-экспрессирующие клетки и вызывают их лизис, обладая потенциалом длительной персистенции и иммунологической памяти [172].

В отличие от TIL, CAR-T-терапия обладает существенным преимуществом, более упрощенным и менее инвазивным производственным циклом, который занимает 2–4 недели [146,175]. Такой короткий срок в сочетании с отсутствием необходимости хирургического сбора опухолевой ткани повышает масштабируемость и доступность терапии, особенно для пациентов с неоперабельными опухолями или требующих срочного лечения.

CAR-T-клеточная терапия имеет несколько важных преимуществ. Во-первых, распознавание антигена происходит независимо от HLA, что облегчает разработку продукта и помогает преодолеть механизмы выхода опухоли, связанные с подавлением HLA. Во-вторых, CAR-T-клетки способны распознавать не только пептидные антигены, но и углеводные и гликолипидные структуры, расширяя спектр потенциальных мишеней. Однако такие антигены ограничены поверхностными молекулами [42,135,168,176,177].

После исследований 2012 и 2014 годов в Memorial Sloan Kettering, подтвердивших эффективность CD19 CAR-T-клеток [178], FDA одобрило в 2017 году препарат Kymriah для лечения острого В-клеточного лимфобластного лейкоза (B-ALL), а в 2018 году, Yescarta для диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL) [179,180]. CAR-T-клеточная терапия произвела революцию в лечении этих гематологических злокачественных новообразований, обеспечив полные ремиссии у 70–90% пациентов с рецидивирующим/рефрактерным B-ALL и 50–60% при ДЛККЛ [180,181]. Их успех обусловлен равномерной экспрессией CD19 на злокачественных В-клетках, минимальной экспрессией в нормальных тканях (за исключением В-клеток, которые можно компенсировать заместительной терапией) и доступным микроокружением опухоли.

CAR-T-клетки против HER2 были исследованы в доклинических и ранних клинических испытаниях при раке молочной железы и других HER2-позитивных опухолях, включая саркомы. Доклинические модели продемонстрировали выраженную

цитотоксичность к HER2-позитивным клеточным линиям (например, SK-BR-3) и регрессию опухолей в ксенотрансплантатах [182]. В фазе I при саркомах отмечались частичные ответы у 4 из 19 пациентов, однако токсичность, включая синдром высвобождения цитокинов (CRS), ограничивала дозу [183]. В 2010 году пациент с метастатическим HER2-позитивным раком толстой кишки получил HER2-CAR-T-клетки третьего поколения, после чего развилась острая токсическая реакция с остановками сердца и дыхания, что привело к летальному исходу спустя 5 дней. Это связывали с низкой экспрессией HER2 в нормальной эпителиальной ткани легких и CRS [184,185]. Однако низкий уровень HER2 в легких не вызывает токсичности при применении других HER2-таргетных средств, таких как Трастузумаб, Пертузумаб, T-DM1 и ингибиторов тирозин-киназы [42,122,135,168,186]. Вопрос о причинах разницы в безопасности между моноклональными антителами и адаптивной T-клеточной терапией остаётся актуальным. Тем не менее, последние исследования показывают обнадеживающие результаты использования CAR-T при HER2-позитивных опухолях [122,185]. В настоящее время проводится множество клинических испытаний для оценки эффективности CAR-T при HER2-позитивных опухолях (например, NCT04727151 [187], NCT00902044 [188]), однако одобренных препаратов для этих опухолей пока нет.

Хотя CAR-T-терапия произвела революцию в лечении гематологических опухолей, у 30–60% пациентов с достижением минимальной остаточной болезни (MRD) происходит рецидив в течение 12 месяцев [189], часто из-за утраты экспрессии CD19 (10–20% рецидивов) или плохой персистенции CAR-T-клеток, связанной с быстрым истощением и высокой опухолевой нагрузкой [179,190]. Долгосрочная токсичность, такая как B-клеточная аплазия и гипогаммаглобулинемия, связана с истощением здоровых B-клеток и повышает риск инфекций [191].

При распознавании антигена CAR-T-клетки выделяют цитокины и хемокины, активирующие иммунную систему и привлекающие эффекторные клетки, что также может вызывать синдром высвобождения цитокинов (CRS), состояние подобное сепсису, требующее интенсивного лечения. Кроме того, цитокины могут стимулировать активацию моноцитов и макрофагов, что ведёт к нарушению гематоэнцефалического барьера и развитию синдрома нейротоксичности, ассоциированного с иммунными эффекторными клетками (ICANS). CRS и ICANS встречаются у 20–40% пациентов и требуют применения тоцилизумаба, кортикостероидов и других мер, особенно при солидных опухолях с высокой антигенной нагрузкой [192,193].

В связи с этим ведутся исследования по оптимизации поддерживающей терапии и созданию CAR-T с меньшей токсичностью [194,195]. Эти проблемы особенно актуальны для адаптации CAR-T к лечению солидных опухолей, таких как HER2-позитивный рак молочной железы. Основными препятствиями являются антигенная гетерогенность (изменение или снижение экспрессии HER2 в устойчивых к терапии клонотипов) [114,196] и иммуносупрессивное микроокружение (гипоксия, кислотность, плотная строма, Treg) [197,198], препятствующие инфильтрации, активации и персистенции CAR-T.

Безопасность остаётся серьёзной проблемой, поскольку низкий уровень экспрессии HER2 в нормальных тканях (легкие, сердце) может привести к внеопухолевой токсичности. CAR-T-клетки обладают мощной и устойчивой активацией, в отличие от моноклональных антител, что усиливает повреждение тканей даже при минимальной экспрессии антигена. Это было наглядно продемонстрировано в отчёте Morgan и др. (2010), где у пациента, получившего T-клетки, трансдуцированные химерным антигенным рецептором, распознающим ERBB2, развилась массивная цитокиновая реакция и летальный исход [184]. Это подчёркивает важность баланса между эффективностью и безопасностью CAR-T-терапии.

### 1.2.3. TCR-T-клетки

Проблема использования CAR-T-клеток для лечения солидных и гематологических опухолей заключается в том, что целевые антигены должны экспрессироваться на поверхности клеток [176]. Альтернативой адоптивной T-клеточной терапии являются TCR-T-клетки, которые представляют собой T-клетки, генетически модифицированные для экспрессии трансгенного T-клеточного рецептора (TCR), распознающего специфические комплексы пептид-HLA I [199] (рисунок 4). В отличие от CAR-T, TCR-T-клетки способны распознавать внутриклеточные антигены, представленные молекулами HLA первого класса, что делает их особенно перспективными для терапии солидных опухолей с внутриклеточными онкогенными факторами, недоступными для прямого воздействия традиционными методами [200].

Использование TCR-T-клеток имеет ряд преимуществ. Во-первых, молекулы HLA могут представлять пептиды как поверхностных, так и внутриклеточных белков, значительно расширяя спектр доступных мишеней. Во-вторых, TCR-T-клетки способны распознавать мутированные (неоантигены) белки, характерные для опухолевых клеток, что повышает селективность терапии. Кроме того, физиологическая передача сигнала через

естественный комплекс TCR-CD3 обеспечивает сбалансированную активацию, потенциально снижая риск выраженной токсичности, включая синдром высвобождения цитокинов (CRS), который наблюдается у 20-40% пациентов при терапии CAR-T [192,201]. Более того, многочисленные исследования показали, что TCR-T-клетки обладают большей чувствительностью к антигенам, по сравнению с CAR-T, несмотря на более низкую экспрессию рецепторов, от 100 до 10 000 копий на клетку у TCR-T-клеток против 10 000–100 000 копий на клетку у CAR-T-клеток [202–205], при этом они секретируют меньше провоспалительных цитокинов, что снижает риск развития синдрома высвобождения цитокинов (CRS) [42,177,206]. Однако CAR-T-клетки демонстрируют более быстрое и мощное цитотоксическое действие в краткосрочной перспективе [207,208], тогда как в условиях высокой антигенной нагрузки TCR-T-клетки поддерживают стабильную пролиферацию и имеют более низкий уровень коингибирующих молекул, обеспечивая сопоставимый или даже более стабильный контроль над опухолью в долгосрочной перспективе [177,203,209].

К числу основных ограничений TCR-терапии относятся её HLA-рестриктивность и риск перекрёстной реактивности с неродственными антигенами [42,177]. HLA-рестриктивность обусловлена необходимостью строгого соответствия между TCR и конкретным аллельным вариантом молекулы HLA пациента, представляющей целевой пептид, что существенно сужает круг потенциальных реципиентов [6,210]. Например, необходимость совместимости с аллелем HLA-A\*02, который, несмотря на свою распространённость в популяциях [211,212], сужает круг подходящих пациентов, усложняет подбор терапии. Кроме того, повышение аффинности TCR, направленное на улучшение распознавания опухолевых антигенов, может сопровождаться повышением токсичности. В частности, это увеличивает риск перекрёстных реакций T-клеточных рецепторов с нецелевыми антигенами, что может приводить к повреждению здоровых тканей («on-target, off-tumor» эффекты) [6,213,214]. Отдельной серьёзной проблемой является иммуносупрессивное микроокружение опухоли (TME), которое включает регуляторные T-клетки, TGF- $\beta$ , фактор некроза опухолей  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и другие иммуномодуляторы. Эти факторы способны значительно подавлять функциональную активность TCR-T-клеток *in vivo*. В связи с этим требуется разработка комбинированных терапевтических подходов, таких как блокада сигнального пути PD-1/PD-L1 с помощью ингибиторов контрольных точек иммунного ответа или генетическая модификация T-клеток для экспрессии провоспалительных цитокинов (например, IL-15). Такие стратегии позволяют повысить выживаемость и сохранить эффекторную активность TCR-T-клеток в условиях

иммуносупрессивного микроокружения опухоли. Дополнительные препятствия включают риск синдрома высвобождения цитокинов (CRS), который, хотя и реже, чем при CAR-T, требует мониторинга и применения таких препаратов, как тоцилизумаб, особенно при высокой опухолевой нагрузке [215].

История TCR-T терапии началась в 1980-х годах с открытия опухоль-специфических антигенов, что дало возможность нацеливаться на внутриклеточные онкогенные механизмы, важные при солидных опухолях, например HER2-позитивном раке молочной железы. В 1984 году ученые начали идентифицировать опухоль-специфические антигены, а в 1991 году была выделен MAGE-A1, антиген рака яичек, экспрессируемый при меланоме, но отсутствующий в большинстве нормальных тканей, что доказало возможность распознавания T-клетками специфичных для рака пептидов, представленных молекулами HLA [216]. В 1993 году был открыт MART-1, антиген меланомы, расширивший список мишеней для T-клеточной терапии [217].

В 1994 году было показано, что T-клетки можно генетически модифицировать для экспрессии специфичных TCR к вирусным антигенам, что подтвердило возможность перепрограммирования T-клеток для целенаправленного распознавания [218]. В 1998 году команда Ричарда Моргана из NCI создала TCR-T-клетки, нацеленные на MART-1, что стало важным шагом к специфичной терапии, несмотря на сохранявшиеся проблемы со стабильностью TCR [219].

Первое клиническое исследование TCR-T стартовало в 2006 году с использованием TCR против MART-1 у 17 пациентов с метастатической меланомой, продемонстрировав безопасность и возможность достижения регрессии опухоли у двух пациентов [219].

Процесс разработки TCR-T-клеток похож на CAR-T терапию (рисунок 3): из периферической крови или опухолевой ткани выделяют антиген-специфичные T-клетки, секвенируют гены TCR, клонируют их в вирусные векторы и трансдуцируют в T-клетки, которые затем размножают *ex vivo*. Трансгенный TCR распознает комплекс пептид-HLA, активирует T-клетку через TCR-CD3, вызывая высвобождение цитокинов, пролиферацию и цитотоксичность [21,220].

TCR-T терапия продемонстрировала многообещающие результаты при лечении солидных опухолей, направленных на внутриклеточные антигены, такие как NY-ESO-1, MAGE-A3/A4, ВПЧ E6/E7 и другие. Клинические испытания при синовиальной саркоме, меланоме, ВПЧ-ассоциированном раке и HER2-позитивном раке молочной железы показали

высокий уровень объективных ответов, устойчивость эффектов и длительную персистенцию клеток [203,221–223].

Однако развитие TCR-T терапии сопровождалось и серьёзными проблемами безопасности. В частности, в 2013 году клиническое исследование TCR против MAGE-A3 было остановлено из-за перекрёстной реактивности с титином, белком кардиомиоцитов, что привело к фатальной кардиотоксичности [224]. Этот случай подчеркнул критическую важность тщательной доклинической оценки специфичности TCR и off-target эффектов.

Современные клинические исследования охватывают широкий спектр антигенов и опухолей, включая KRAS G12D, WT1, MAGE-A4, PRAME и другие [225–227]. К настоящему времени Afamitresgene autoleucel (Tecelra) является первой TCR-T терапией, одобренной U.S. Food and Drug Administration (FDA), в августе 2024 года, для лечения нерезектабельной или метастатической синовиальной саркомы, экспрессирующей MAGE-A4 при наличии соответствующего HLA (например, HLA-A\*02:01), что стало историческим достижением в терапии солидных опухолей [228].

Эти клинические успехи подчёркивают потенциал TCR-T клеток для терапии HER2-позитивного рака, учитывая их способность распознавать внутриклеточные антигены, представленные в комплексе с HLA, и тем самым обходить ограничения, связанные с вариабельностью поверхностной экспрессии HER2 и развитием резистентности к Трастузумабу [229]. Однако клинические данные для HER2-специфичных TCR-T остаются ограниченными. В частности, в исследовании I фазы с использованием HER2-пептидов при глиобластоме стабилизация заболевания была достигнута у 3 из 16 пациентов. Доклинические исследования эпитопа HER2 (E75) при раке молочной железы также показали способность индуцировать противоопухолевый иммунный ответ и замедление роста опухоли, тогда как клинические данные пока указывают преимущественно на стабилизацию заболевания, а не выраженные объективные ответы [229].

В таблице 2 представлено детальное сравнение механизмов действия, преимуществ и ограничений CAR-T и TCR-T-клеток.

Таблица 2: Сравнительная характеристика терапевтических подходов на основе CAR-T и TCR-T-клетки.

Аспект	CAR-T	TCR-T
<b>Антигены-мишени</b>	Поверхностные (например, внеклеточные HER2) [94]	Внутриклеточные (например, HLA-рестриктивные пептиды) [229]
<b>Рестрикция HLA</b>	HLA-независимые [230]	HLA-специфичные (например, HLA-A*02) [231]
<b>Структура рецептора</b>	Синтетическая (scFv + костимулирующий домен + CD3 $\zeta$ ) [232]	Природные $\alpha$ - и $\beta$ -цепи TCR [203]
<b>Механизм передачи сигналов</b>	Синтетический, усиленный костимулирующими доменами (например, CD28, 4-1BB) [177]	Физиологический, через комплекс TCR-CD3 [233]
<b>Распознавание антигена</b>	Прямое связывание с поверхностными антигенами. Высокоаффинное связывание с поверхностными антигенами [139]	Связывание с комплексами пептид-HLA. Низкоаффинное связывание, имитирующее естественные Т-клетки [234]
<b>Аффинность</b>	Высокая [235]	От низкой до умеренной [221]
<b>Эффективность при солидных опухолях</b>	Ограниченная (барьеры TME, гетерогенность антигенов) [196]	Перспективная (нацелены на внутриклеточные антигены) [226]
<b>Риски для безопасности</b>	CRS, нейротоксичность, противоопухолевый эффект [236]	Эффекты, не связанные с мишенью, неправильное сочетание TCR [224]
<b>Производство</b>	Стандартизированное, scFv-специфичное, но дорогостоящее и длительное (2–4 недели) [141]	Идентификация HLA-специфичных TCR увеличивает затраты и время (2–4 недели) [227]
<b>Проблемы, связанные с HER2</b>	Ограничено подавлением экспрессии HER2 в нормальных тканях [184]	Обходит подавление экспрессии на поверхности [237]
<b>Клиническая стадия HER2</b>	Фаза I/II, частичный ответ при саркомах, проблемы с токсичностью [183]	Доклиническая/ранняя фаза I, перспективна для резистентных моделей [229]

#### 1.2.4. Другие виды адаптивной клеточной терапии

Помимо хорошо зарекомендовавших себя методов лечения, таких как TIL, CAR-T и TCR-T, в настоящее время разрабатывается несколько инновационных подходов адаптивной клеточной терапии для борьбы с раком, особенно с солидными опухолями, включая HER2-положительный рак молочной железы. Эти методы используют различные типы иммунных клеток для усиления противоопухолевой активности.

Терапия TCR-подобными CAR-T-клетками, гибридный подход, при котором T-клетки оснащаются CAR-конструкцией, включающей фрагмент антитела, имитирующий TCR и распознающий внутриклеточные опухолевые антигены, представленные молекулами HLA. Таким образом объединяется специфичность TCR и надёжная передача сигналов CAR. Этот метод обеспечивает направленное уничтожение опухолевых клеток с потенциально меньшим риском неправильного спаривания TCR по сравнению с классической TCR-T терапией, однако также ограничен по HLA и находится на ранних клинических стадиях [238,239].

Клеточная терапия естественными киллерами (NK-клетками) использует клетки врождённого иммунитета, способные убивать опухолевые клетки без необходимости ограничения по HLA или предварительной сенсibilизации. NK-клетки могут быть аутологичными (от самого пациента) или аллогенными (донорскими или из пуповинной крови). Это даёт возможность создавать готовые препараты с пониженным риском развития реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) благодаря отсутствию HLA-специфичности, хотя ограниченная персистенция *in vivo* остаётся серьёзной проблемой [240].

CAR-NK-терапия, модификация NK-клеток с экспрессией CAR, объединяющая их естественные способности к уничтожению опухолей с антиген специфическим распознаванием. По сравнению с CAR-T-клетками, CAR-NK могут в меньшей степени вызывать синдрома высвобождения цитокинов (CRS) и позволяют применять аллогенные подходы без необходимости HLA-совместимости. Первые клинические испытания продемонстрировали обнадеживающие результаты при лечении солидных опухолей, несмотря на производственные сложности [241].

CAR-терапия макрофагами направлена на усиление способности макрофагов фагоцитировать опухолевые клетки и представлять антигены T-клеткам, что усиливает иммунный ответ. Однако клиническое применение этой методики только начинается из-за технических сложностей с инженерией макрофагов и их инфильтрацией в опухолевую ткань [239].

Клеточная CAR- $\gamma\delta$ -T терапия использует  $\gamma\delta$ -T-клетки, подмножество T-лимфоцитов, распознающих фосфорилированные антигены, широко представленные в опухолях. Экспрессия CAR повышает их противоопухолевую активность, но из-за низкой численности  $\gamma\delta$ -T-клеток и ранней стадии исследований потенциал терапии пока ограничен [242].

CAR-NKT терапия направлена на естественных T-киллеров (NKT), которые служат

связующим звеном между врождённым и адаптивным иммунитетом, и обладают способностью распознавать липидные антигены и модулировать иммунные реакции. CAR-модификация усиливает их активность, однако клинических данных пока мало из-за высокой сложности производства [239].

Терапия дендритными клетками (ДК) основана на использовании мощных антиген-презентирующих клеток, нагруженных опухолевыми антигенами или генетически модифицированных для экспрессии опухоль-специфичных пептидов, что стимулирует Т-клеточный ответ. Несмотря на то, что вакцина Sipuleucel-T одобрена для лечения рака предстательной железы, её эффективность при раке молочной железы остаётся ограниченной, а процесс подготовки препарата является сложным [243].

Эти новые методы, преимущественно находящиеся на ранних этапах клинических исследований, используют нетрадиционные иммунные клетки, уникальные подгруппы Т-клеток или гибридные рецепторные конструкции, предлагая преимущества, такие как снижение токсичности, возможность аллогенного применения и распознавание различных антигенов. Их эффективность в лечении солидных опухолей, включая HER2-позитивный рак молочной железы, активно изучается в дополнение к уже применяемым подходам TCR-T и CAR-T.

### **1.2.5. Почему TCR-T и TCR-подобная CAR-T терапия эффективны при HER2-позитивном раке**

TCR-T и TCR-подобная CAR-T терапия демонстрируют высокую эффективность при HER2-позитивном раке благодаря способности распознавать и взаимодействовать с пептидными эпитопами HER2, происходящими из внутриклеточных доменов HER2-рецептора и представленными в комплексе с молекулами HLA класса I (рисунок 4). Такой механизм позволяет преодолевать резистентность к Трастузумабу и конъюгатам антитело-лекарственный препарат, связанную с усечением или подавлением регуляции HER2, расширяя возможности иммунотерапии при рефрактерных формах заболевания [114,229,244].

В отличие от классической CAR-T терапии, нацеленной на поверхностные антигены и часто вызывающей серьёзную токсичность, такую как синдром высвобождения цитокинов (CRS) с частотой 20–40%, TCR-T и TCR-подобные CAR-T обеспечивают более физиологичную или усиленную передачу сигналов. Это способствует снижению токсичности при сохранении высокой противоопухолевой активности [192,196].

Кроме того, TCR-подобная CAR-T терапия снижает риск неправильного спаривания TCR, предлагая гибридное преимущество: сочетание специфичности TCR с надёжностью и эффективностью CAR-конструкций. Это делает оба подхода перспективными для лечения опухолей, резистентных к стандартным методам, несмотря на ограничения, связанные с HLA-типированием [238].

## Глава 2. Экспериментальная часть

### 2.1. Материалы

#### 2.1.1. Реактивы и препараты

В исследовании были использованы следующие реактивы и препараты:

- **Антикоагулянты и растворы для выделения клеток:**
  - Ваккумные пробирки для забора периферической крови с КЗ ЭДТА (GONGDONG, Китай)
  - Раствор фиколла–урографина (плотность 1,077 г/мл, кат. № 17-1440-03, ПанЭко, Россия)
  
- **Среды и добавки:**
  - Среда RPMI-1640 (Биолот, Россия)
  - Среда DMEM (ПанЭко, Россия)
  - Среда GT-T551 (WK552S, Takara Bio, США)
  - Среда Opti-MEM (Gibco, США)
  - HEPES (Биолот, Россия)
  - Глутамин (Биолот, Россия)
  - Гентамицин (ПанЭко, Россия)
  - Бензилпенициллин (Синтез, Россия)
  - 2-Меркаптоэтанол (Sigma, США)
  - Фетальная телячья сыворотка (LT Biotech, Литва)
  - Эмбриональная сыворотка телят (FCS) (HIMEDIA, Индия)
  - Раствор трипанового синего («Биолот», Россия)
  
- **Цитокины:**
  - Рекомбинантный человеческий GM-CSF (кат. № 572904, BioLegend, США)
  - IL-4 (кат. № 574006, BioLegend, США)
  - TNF- $\alpha$  (№ 570108, BioLegend, США)
  - IL-2 (кат. № 589106, BioLegend, США)
  - IL-7 (№ 581906, BioLegend, США)
  - IL-15 (№ 570306, BioLegend, США)
  
- **Антитела и флуорофоры:**

- Анти-HLA-A2 (конъюгированные с PE, кат. № 343306, BioLegend, США)
- Анти-CD3 (кат. № 830301, BioLegend, США)
- Анти-CD28 (кат. № 302902, BioLegend, США)
- Стрептавидин-PE (кат. № 405203, BioLegend, США)
- Стрептавидин-APC (кат. № 405207, BioLegend, США)
- BD® Single-Cell Multiplexing Kit (кат. № 633781, BD Biosciences, США)

- **Пептиды и тетрамеры:**

- Пептид KIFGSLAFL (Immunotex, Россия)
- Тетрамеры Flex-T (кат. № 280014, BioLegend, США)

- **Наборы:**

- Набор MojoSort Human CD8 T Cell Isolation Kit (кат. № 480012, BioLegend, США)
- Набор Human CD3 T Cell Isolation Kit (кат. № 480022, BioLegend, США)
- Набор LEGEND MAX™ Flex-T™ для иммуноферментного анализа (кат. № 447207, BioLegend, США)
- Набор BD Rhapsody™ Targeted mRNA and AbSeq Amplification Kit (кат. № 633774, BD Biosciences, США)
- Набор BD Rhapsody™ TCR/BCR Amplification Kit (кат. № 665345, BD Biosciences, США)
- Панель Human Immune Response Panel (399 пар праймеров, кат. № 633750, BD Biosciences, США)
- Магнитные шарики AMPure XP (кат. № A63880, Beckman Coulter, США)
- Набор Qubit dsDNA HS Assay Kit (кат. № Q32854, Thermo Fisher Scientific, США)
- Набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid-20 maxi (Biolabmix, Россия)
- Раствор для осаждения лентивируса TransLv™ (5×, FV101-01, TransGen, Китай)
- Набор для qPCR-титрования лентивирусов TransLv™ (FV201-01, TransGen, Китай)
- Набор для выделения геномной ДНК (SKU 24700, Norgen Biotek, Канада)
- CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (кат. № G1780, Promega, США)
- Панель LegendPlex Human CD8/NK (кат. № 741187, BioLegend, США)
- Панель BD Rhapsody™ Onco-BC Panel HS (кат. № 633752, BD Biosciences, США)

США)

- **Ферменты и химические вещества:**

- Раствор Дюльбекко (Биолот, Россия). Далее мы будем употреблять термин PBS (фосфатный буферный раствор)
- раствор Версена (Биолот, Россия).
- Раствор Версена+0,1% NaN<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, США) – PBS для проточной цитометрии
- Раствор Версена +0,5% бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США) – буфер для магнитной сортировки
- Трипсин (ПанЭко, Россия)
- Раствор Версена (Vector, Россия)
- Уксусная кислота
- Кальцеин (кат. № 564061, BD Biosciences, США)
- Fibronectin Fragment Human recombinant, рекомбинантный белок (Sci Store, Россия)
- Протамин сульфат (ЭЛЛАРА, Россия)
- Раствор цитрат-декстрозы А (ACDA)

- **Плазмиды:**

- Плазмиды Gag-Pol, Rev и VSV-G (Life Science Market, Китай)
- Плазида pLenti hPGK GFP (Lumiprobe RUS Ltd., Россия)

## 2.1.2. Оборудование

В работе использовалось следующее оборудование:

- Сортировщик клеток BD FACS Aria I (BD Biosciences, США)
- Проточный цитометр Attune NxT (Thermo Fisher Scientific, США)
- Гаматологический анализатор Celltac α (Nihon Kohden, Япония)
- Центрифуги лабораторные Elmi (Латвия), Jouan MR 23i (Франция)
- Автоматический счетчик клеток Countess 3 (Thermo Fisher Scientific, США)
- Анализатор IN Cell Analyzer 6000 (GE HealthCare, США)
- Секвенатор NovaSeq 6000 (Illumina, США)
- Амплификатор CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США)
- Флуорометр Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США)

- Анализатор биочипов Agilent BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, США)
- Система BD Rhapsody (BD Biosciences, США)

### 2.1.3. Пластик

- Микроскоп (производитель не указан)
- Колбы T75 (TRP, кат. № 90075, Швейцария)
- 12-луночные и 24-луночные планшеты (TRP, Швейцария)
- 96-луночные планшеты с плоским дном (TRP, Швейцария)
- Планшеты, культуральные флаконы для культивирования клеток («TRP», Швейцария),
- Цитометрические пробирки, полистироловые 12\*75, 5 мл (Axygen)
- MojoSort™ Magnet cat#480019 (Biolegend, США)
- Чашки Петри 100 мм
- Пробирки Falcon 50 мл
- Пробирки Eppendorf 1,5 мл

### 2.1.4. Программное обеспечение

Для обработки и анализа данных использовалось следующее программное обеспечение:

- GraphPad Prism 10.2.3 (GraphPad Software, Inc., США)
- Pandas [245]
- Bioinfokit [246]
- Конвейер BD Rhapsody (BD Biosciences, США)
- TCRscape [247]
- ERGO-II [248]
- Инструмент оптимизации кодонов (Codon Optimization Tool (ExpOptimizer)) [249]

### 2.1.5. Клеточные культуры

В исследовании использовались следующие клеточные культуры:

- Клеточная линия HEK293T (любезно предоставленные Хироши Шику (Университет Миэ, Япония)
- Клеточная линия SK-Mel-5 (любезно предоставленные Хироши Шику (Университет Миэ, Япония)
- Клеточная линия SK-Mel-37 (любезно предоставленные Хироши Шику

(Университет Миэ, Япония)

- Клеточная линия НСТ-116 (любезно предоставленные Хироши Шику (Университет Миэ, Япония)
- Клеточная линия MDA-MB-231 (любезно предоставленные Хироши Шику (Университет Миэ, Япония)
- Мононуклеарные клетки периферической крови (МНК) от здоровых доноров

#### **2.1.6. Лабораторные животные**

Для моделирования ксенотрансплантатов использовались иммунодефицитные мыши линии SCID, полученные из Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия).

## 2.2. Методы

### 2.2.1. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (МНК)

У доноров периферическая кровь отбиралась в вакуумные пробирки, содержащие антикоагулянт ЭДТА. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (МНК) осуществляли методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла-урографина.

Для этого цельную кровь разводили в соотношении 1:1 средой RPMI-1640 (Biolot, Россия) и аккуратно наслаивали поверх раствора фиколла-урографина с плотностью 1,077 г/мл. Образцы центрифугировали при  $400 \times g$  в течение 40 минут при комнатной температуре без торможения. После центрифугирования мононуклеарный слой, расположенный на границе раздела фаз, аккуратно собирали по всему поперечному сечению пробирки для последующего использования.

### 2.2.2. Клональная экспансия HER2/neu-специфичных CD8<sup>+</sup> лимфоцитов

В исследование были включены семь здоровых взрослых доноров, предварительно отобранных по наличию аллеля HLA-A\*02 с использованием проточной цитометрии с PE-конъюгированными антителами к человеческому HLA-A2. Средний возраст доноров составил  $27,33 \pm 6,34$  года (среднее  $\pm$  стандартная ошибка), среди них было четыре женщины и трое мужчин. Все участники дали письменное информированное согласие в соответствии с этическими нормами.

Для получения достаточного количества антиген-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) использовали дендритные клетки (ДК), обладающие способностью захватывать, обрабатывать и представлять антигены посредством молекул HLA класса I и II, что стимулирует клональную экспансию и дифференцировку наивных Т-клеток в эффекторные [250]. Разработан эффективный многоэтапный протокол, основанный на собственных методах с подтвержденной эффективностью [251–253]. Все приведённые концентрации реагентов относятся к конечным значениям в реакционной смеси.

#### Этап 1: Получение и созревание дендритных клеток

МНК, выделенные ранее, разделяли на прилипающую и не прилипающую фракции путем инкубации клеток при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 30 минут, что позволяло более адгезивным клеткам моноцитарной природы прикрепиться к поверхности. Прилипающую фракцию ( $20\text{--}25 \times 10^6$  клеток,  $1\text{--}2 \times 10^6$  клеток/мл) культивировали во флаконах площадью

75 см<sup>2</sup> в среде с рекомбинантным человеческим GM-CSF (100 нг/мл) и IL-4 (50 нг/мл) в течение 4 дней. На 3-й день среду частично заменяли. На 5-й день в культуру добавляли HLA I-рестриктированный пептид KIFGSLAFL (30 мкг/мл) (далее KIF, соответствует аминокислотам 369–377 белка HER2/neu), синтезированный компанией Immunotex (Россия), а на 6-й день индуцировали созревание дендритных клеток с помощью фактора некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ , 25 нг/мл).

## **Этап 2: Выделение CD8<sup>+</sup> Т-клеток**

CD8<sup>+</sup> Т-клетки выделяли из не прилипающей фракции МНК методом отрицательной магнитной селекции с использованием набора MojoSort Human CD8 T Cell Isolation Kit согласно инструкции производителя. Выделенные CD8<sup>+</sup> Т-клетки ( $2 \times 10^6$  клеток/мл) культивировали 6 дней в присутствии IL-2, IL-7 и IL-15 (по 10 нг/мл). На 3-й день среду полностью заменяли и добавляли свежие цитокины, а также анти-CD3 (0,5 мкг/мл) и анти-CD28 (1 мкг/мл). Кондиционную среду отбирали на 6-й день для дальнейшего использования.

## **Этап 3: Совместное культивирование ДК и CD8<sup>+</sup> Т-клеток**

На 7-й день зрелые KIF-нагруженные ДК ( $1-2 \times 10^6$  клеток/мл) совместно культивировали с предварительно стимулированными CD8<sup>+</sup> Т-клетками в соотношении 1:10 (ДК:CD8<sup>+</sup>) во флаконах площадью 75 см<sup>2</sup>. В течение первых 3 дней культивирование проводили без дополнительной стимуляции для удаления неактивированных Т-клеток. На 4-й день добавляли анти-CD3 (0,5 мкг/мл), анти-CD28 (1 мкг/мл), IL-2, IL-7 и IL-15 (по 10 нг/мл) для поддержания жизнеспособности и пролиферации антигенспецифичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

## **Этап 4: Выделение антигенспецифичных Т-клеток**

После 7–8 дней совместного культивирования KIF-специфичные Т-клетки выделяли двухэтапным методом. Сначала дендритные клетки удаляли с помощью негативной магнитной селекции, используя набор MojoSort Human CD8 T Cell Isolation Kit. Затем антиген-специфичные Т-клетки сортировали с использованием тетрамеров Flex-T, конъюгированных со стрептавидином, меченым фикоэритрином (PE) и аллофикоцианином (APC), нагруженных пептидом KIF согласно протоколу производителя. Эффективность пептидного обмена оценивали с помощью набора LEGEND MAX™ Flex-T™ для иммуноферментного анализа, что подтвердило замещение УФ-лабильного пептида на 80%.

Сортировку проводили на сортировщике BD FACS Aria I (BD Biosciences, США) при давлении 20 psi, в режиме «Чистоты» и со скоростью до 2500 событий в секунду. Морфологически жизнеспособные лимфоциты отбирали на основании параметров прямого и бокового рассеяния света, после чего выделяли антигенспецифичную популяцию Т-клеток, идентифицируемую как клетки с двойной положительной окраской тетрамерами, меченными флуорохромами APC и PE (рисунок 5).

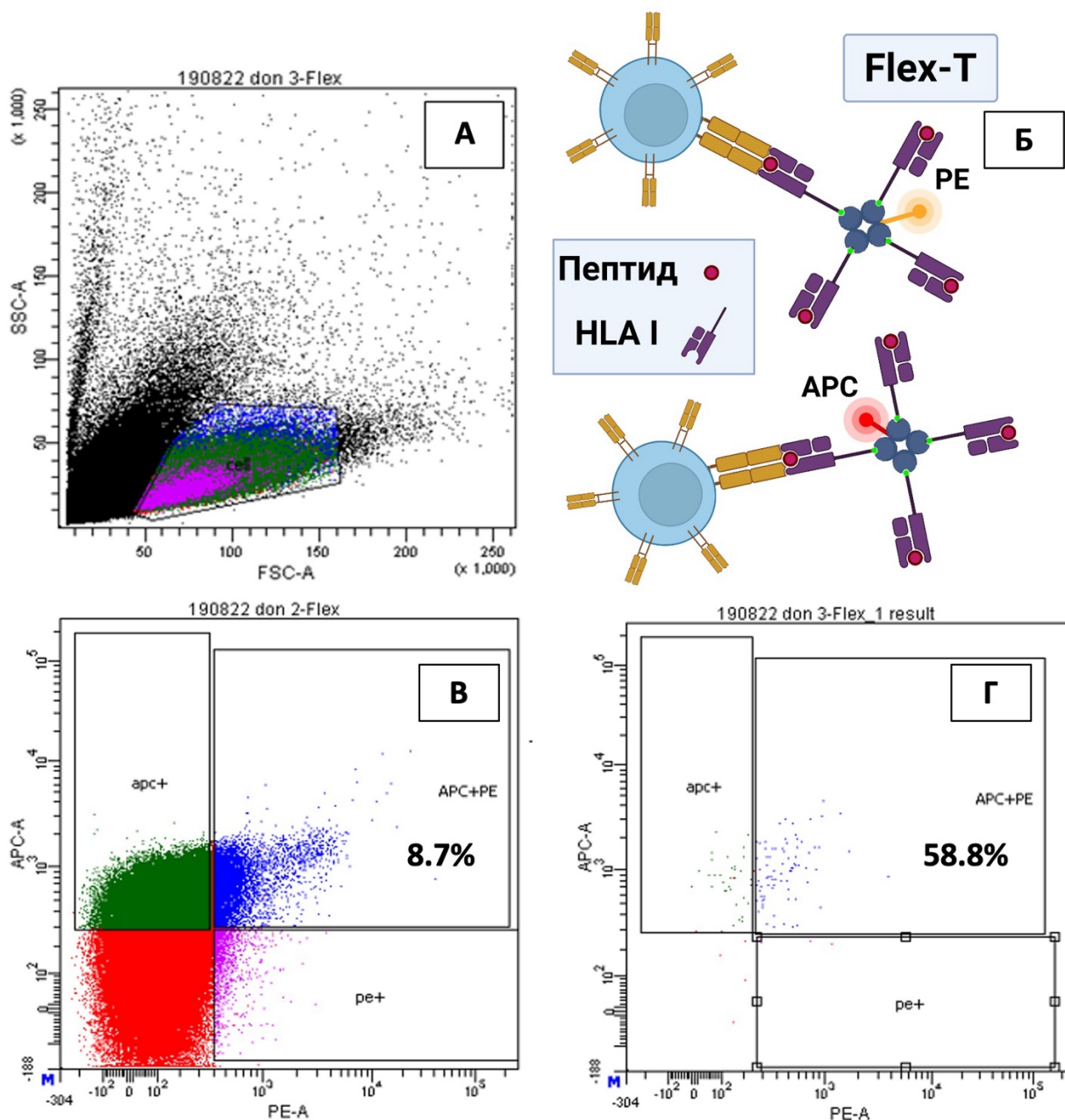


Рисунок 5. Стратегия выделения антигенспецифических Т-клеток из популяции лимфоцитов с использованием технологии Flex-T. А) Гейтирование популяции лимфоцитов по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния для отбора морфологически жизнеспособных лимфоцитов; Б) Схематическое изображение технологии Flex-T; В, Г)

Оценка чистоты популяции антигенспецифичных Т-клеток до и после проведения сортировки, при этом клетки-мишени одновременно окрашиваются тетрамерами, конъюгированными с флуорохромами APC и PE. Показанные проценты отражают долю клеток с двойной положительной окраской (PE<sup>+</sup>/APC<sup>+</sup>).

### **Этап 5: Экспансия антигенспецифичных Т-клеток *in vitro***

Отсортированные KIF-специфичные Т-клетки ( $2-4 \times 10^6$  клеток/мл) культивировали в планшетах с плоским дном в смеси RPMI-1640 (Biolot, Россия) и кондиционированной среды из исходной культуры CD8<sup>+</sup> Т-клеток (1:1). Культуру стимулировали анти-CD3 (0,5 мкг/мл), анти-CD28 (1 мкг/мл), IL-2, IL-7 и IL-15 (по 10 нг/мл). При оценке состояния клеток особое внимание уделяли образованию агрегатов в культуре; при необходимости клетки пересевали для достижения требуемого количества, необходимого для дальнейшего применения. Общая длительность культивирования составляла 14–21 день.

### **2.2.3. Идентификация HER2-специфических TCR методом секвенирования мРНК единичных клеток**

#### **Штрихкодирование образцов и подсчет клеток для анализа единичных клеток**

Для анализа были отобраны HER2/неу-специфичные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты от трёх доноров (четыре других донора исключены из-за недостаточного количества и низкой выживаемости антиген-специфичных Т-клеток). Клетки инкубировали с антителами Sample Tag из набора для мультиплексирования единичных клеток BD™ в течение 20 минут при комнатной температуре, после чего трижды промывали для удаления несвязавшихся антител. Далее клетки окрашивали кальцеином согласно руководству пользователя системы BD Rhapsody. Количество клеток определяли с помощью проточного цитометра Attune NxT (Thermo Fisher Scientific, США) и автоматического счетчика клеток Countess 3 (Thermo Fisher Scientific, США). Клетки трёх доноров объединяли, ресуспендировали в холодном буфере BD Rhapsody до конечной концентрации 40 клеток/мкл в объёме 620 мкл и загружали в картридж BD Rhapsody. Качество и количество нагруженных клеток оценивали визуально с помощью IN Cell Analyzer 6000 (GE HealthCare, США), при этом флуоресценция кальцеина использовалась для визуализации. Расчет производится как среднее количество кальцеин-положительных клеток в пяти полях зрения (FOV), разделенное на 175 (число микроячеек в одном поле зрения) и умноженное на 200 000 (общее количество микроячеек в картридже).

#### **Подготовка библиотеки к секвенированию**

Захват единичных клеток и подготовка библиотек проводились с использованием системы экспресс-анализа единичных клеток BD Rhapsody (BD Biosciences, США) согласно протоколу производителя (TCR/BCR Full Length, Targeted mRNA, and Sample Tag Library Preparation Protocol). Для анализа целевой мРНК, связанной с иммунной функцией, и полных последовательностей TCR применялись наборы BD Rhapsody™ Targeted mRNA and AbSeq Amplification Kit и BD Rhapsody™ TCR/BCR Amplification Kit.

Клетки загружали в картридж BD Rhapsody и добавляли магнитные шарики с поли-Т-хвостами для захвата мРНК и Sample Tag через их поли-А-хвосты, после чего клетки лизировали. Обратная транскрипция захваченной мРНК и молекул Sample Tag проводилась непосредственно на магнитных шариках. Затем добавляли олигонуклеотиды с переключателем шаблона (Template Switch Oligos, TSO) и выполняли второй раунд обратной транскрипции (рисунок 6). После завершения реакции проводили инкубацию при 95 °С для денатурации и отделения цепей ДНК Sample Tag с целью их последующей амплификации в первом раунде ПЦР (Sample Tag ПЦР1). Непосредственно после этапа денатурации проводили самогибридизацию иммобилизованной на магнитных шариках кДНК с адаптерными последовательностями для формирования петлевых структур. Затем выполняли удлинение кДНК с помощью фрагмента ДНК-полимеразы Klenow, после чего шарики обрабатывали экзонуклеазой I для удаления одноцепочечных фрагментов. Далее амплифицировали кДНК с использованием TCR-специфичных праймеров и собирали продукты TCR ПЦР1. После этого проводили дополнительный раунд ПЦР на кДНК с применением панели праймеров для иммунного ответа человека (Human Immune Response Panel), содержащей 399 пар праймеров, нацеленных на 397 различных генов, и собирали продукты ПЦР1 панели мРНК.

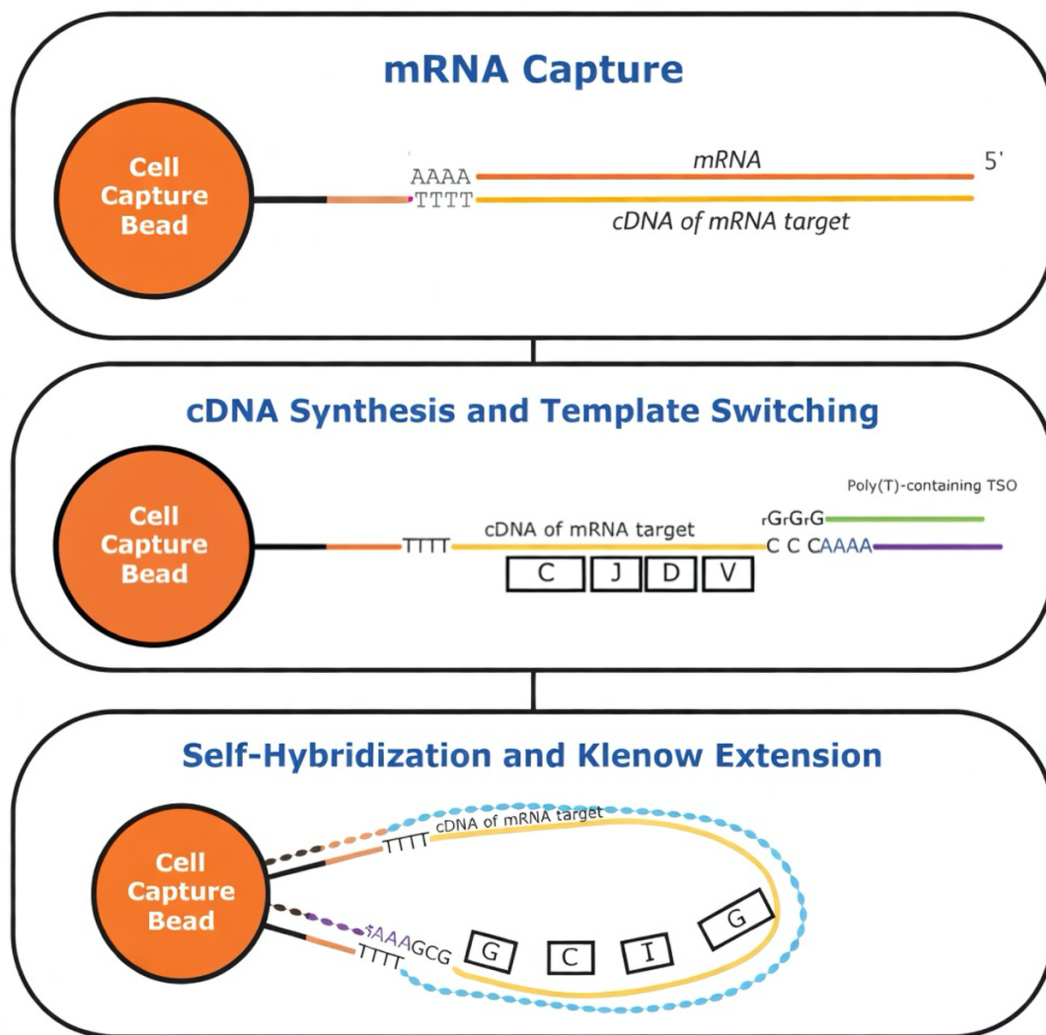


Рисунок 6. Механизм захвата 5'-концевых последовательностей мРНК с использованием технологии переключения шаблона (Template Switching). (А) Захват мРНК: Гибридизация поли(А)-хвостов мРНК на магнитных шариках с олиго(дТ)-праймерами. (Б) Синтез кДНК и Template Switching: Обратная транскрипция с последующим добавлением TSO-олигонуклеотида для захвата 5'-концевых последовательностей (V(D)J-сегментов) цепей TCR. (В) Самогибридизация и достраивание: Формирование петли и синтез второй цепи кДНК для иммобилизации полноразмерной матрицы на шарик перед амплификацией.

Затем продукты ПЦР1 для TCR, панели мРНК и Sample Tag очищали по размеру с помощью магнитных шариков AMPure XP. Очищенные продукты TCR, панели мРНК и Sample Tag ПЦР 1 дополнительно амплифицировали в полугнездовой ПЦР2 для повышения специфичности обнаружения транскриптов и очищали полученные продукты ПЦР2 с помощью магнитных бус AMPure XP. После этого, концентрацию продуктов TCR ПЦР2 оценивали с помощью Qubit 4 и набора Qubit dsDNA HS Assay Kit и нормализовали до 1,8 нг/мкл и проводили TCR RPE (Random Priming and Extension) амплификацию с использованием случайных праймеров и ДНК-полимеразы Klenow, после чего продукты

TCR RPE очищали двусторонним отбором с помощью AMPure XP.

Концентрацию продуктов панели мРНК ПЦР2, TCR RPE и Sample Tag ПЦР2 оценивали с помощью Qubit 4 и набора Qubit dsDNA HS Assay Kit и нормализовали продукты панели мРНК ПЦР2 и Sample Tag ПЦР2 до 1,0 нг/мкл, а TCR RPE использовали без разведения. Заключительный этап амплификации с использованием индексов для секвенаторов Illumina позволил подготовить конечные библиотеки. Их количественно оценивали с помощью Qubit 4 (набора Qubit dsDNA HS Assay Kit) и Agilent BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, США). Библиотеки объединяли до конечной концентрации 2 нМ в соотношении примерно 81% TCR, 12% панель мРНК и 7% Sample Tag, обеспечивая ~15 000 считываний на клетку для TCR, 2200 для панели мРНК и 1200 для маркировки образцов (Sample Tag). Итоговые библиотеки секвенировали в компании «Евроген» (Москва, Россия) на платформе NovaSeq 6000 (Illumina, США) с использованием проточной ячейки S2. Секвенирование проводили в режиме асимметричных парноконцевых чтений (R1 = 85 циклов, R2 = 225 циклов) с выходом около 600 млн кластеров.

### **Обработка данных секвенирования**

Мы обработали файлы FASTQ, полученные с секвенатора, с использованием конвейера BD Rhapsody 1.11.1L. Конвейер удалял пары прочтений низкого качества на основе длины прочтения, среднего значения качества по базам и частоты встречаемости наиболее распространённого нуклеотида; анализировал оставшиеся высококачественные чтения R1 для идентификации последовательностей клеточных меток и уникальных молекулярных идентификаторов (Unique Molecular Identifier, UMI); сопоставлял оставшиеся высококачественные чтения R2 с последовательностями контрольной панели (мРНК) с помощью Bowtie2; объединял чтения с одинаковыми клеточными метками, идентичными последовательностями UMI и соответствующими одному и тому же гену, в одну молекулу; корректировал полученные значения с помощью алгоритмов исправления ошибок, включая рекурсивную подстановочную коррекцию ошибок (Recursive Substitution Error Correction, RSEC) и коррекцию на основе распределения (Distribution-Based Error Correction, DBEC), для учёта ошибок секвенирования и ПЦР; и оценивал количество клеток методом анализа второй производной, позволяющим отфильтровать зашумленные клеточные метки, определив единственную точку перегиба и рассматривая все метки после неё как шум.

Далее конвейер использовал олигонуклеотид-конъюгированные антитела с молекулярным штрихкодированием (набор для мультиплексирования единичных клеток

BD™, Sample Tag) для демультимплексирования образцов и удаления мультиплетов, в результате чего было выделено 4989 единичных клеток. После этого конвейер выполнил выравнивание чтений библиотеки TCR для каждой клетки, собрал контиги TCR, провёл их аннотацию и сформировал матрицы экспрессии генов для каждого биологического образца, а также совокупную матрицу репертуара адаптивных иммунных рецепторов на основе полученных контигов TCR. Демультимплексирование и фильтрация мультиплетов выполнялись с использованием молекулярных штрих-кодов BD™, в результате чего идентифицировали 4989 одиночных клеток. Считывания TCR выравнивали по каждой клетке для построения контигов, которые аннотировали для создания матриц экспрессии генов и совокупного репертуара адаптивных иммунных рецепторов (Adaptive Immune Receptor Repertoire, AIRR).

### **Прогнозирование вероятности связывания TCR с комплексом пептид/HLA и характеристика фенотипа клонотипов**

Для прогнозирования вероятности связывания TCR с комплексом пептид/HLA использовали нейронную сеть ERGO-II [248,254] с базой данных (McPAS-TCR) [255]. Для работы ERGO-II требуются данные о последовательностях TCR CDR3 $\alpha$  и CDR3 $\beta$ , пептидная последовательность, тип HLA, гены V и J, а также тип T-клетки. На выходе формировался файл с прогнозируемыми значениями вероятности связывания T-клеточного рецептора с комплексом пептид/HLA, варьирующимися от 0 до 1, где 0 соответствует минимальной, а 1 максимальной прогнозируемой способности связывания.

Затем мы импортировали матрицы экспрессии генов каждого биологического образца, а также прогнозируемые вероятности связывания TCR–пептид–HLA и матрицу репертуара адаптивных иммунных рецепторов (AIRR) в TCRscape [247] (рисунок 7). Далее мы выполнили логарифмическую нормализацию по  $\log_2$  (Counts per Million, CPM) объединённой матрицы и подсчитали полноразмерные TCR-клонотипы. После этого был проведён анализ главных компонент (Principal Component Analysis, PCA) объединённой матрицы для оценки размерности данных, а также редукция размерности методом аппроксимации и проекции однородного многообразия (Uniform Manifold Approximation and Projection, UMAP) с объединением информации о клонотипах, прогнозируемых вероятностях связывания и экспрессии генов. На следующем этапе мы выполнили кластеризацию клеток с помощью алгоритма HDBSCAN [256] и определили доминирующий клонотип, основываясь на прогнозируемой оценке вероятности связывания и количестве клеток на каждый клонотип.

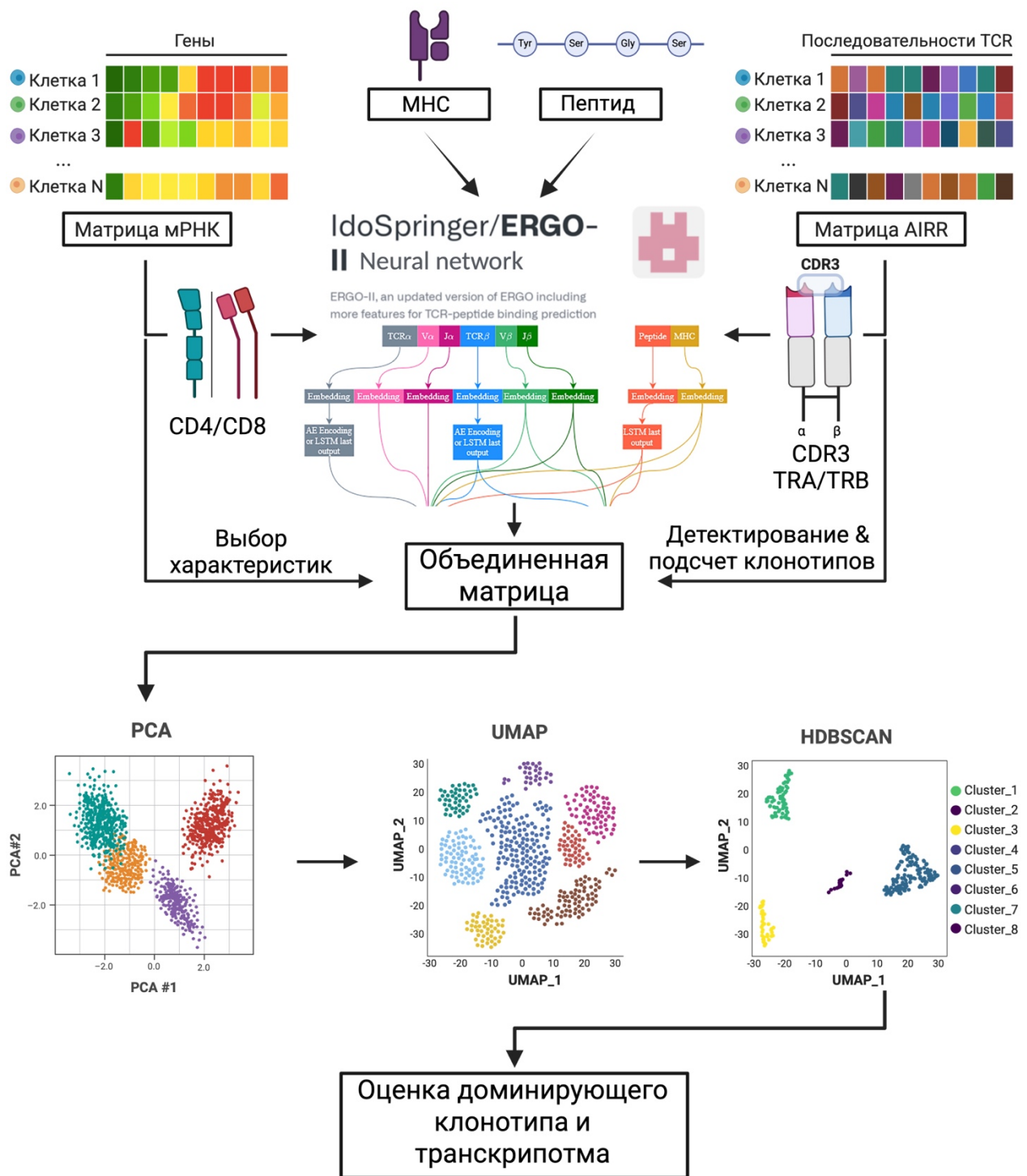


Рисунок 7. Алгоритм биоинформатического анализа данных scRNA-seq и TCR-seq с использованием инструмента TCRscape.

## 2.2.4. Клонирование TCR

### Конструкция трансферной плазмиды

Последовательности TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , а также другие элементы вставки были оптимизированы с использованием инструмента Insertion Optimization Tool [249] с

добавлением сайтов рестрикции BamHI и BsrGI. Плазмида была синтезирована компанией Lumiprobe RUS Ltd. (Россия), обеспечивающей получение высококачественной ДНК, свободной от загрязнений, проверенной с помощью секвенирования по Сэнгеру для подтверждения целостности UTR-последовательностей TCRA, TCR $\beta$ , P2A и  $\beta$ -глобина. Трансферная плазмида была сконструирована на основе вектора ВИЧ-1 pLenti hPGK GFP с заменой гена EGFP на целевую вставку (рисунок 8). Этот вектор использовали для получения лентивирусов, несущих ген, кодирующий выбранного клонотипа TCR, специфичного к антигену HER2/neu.

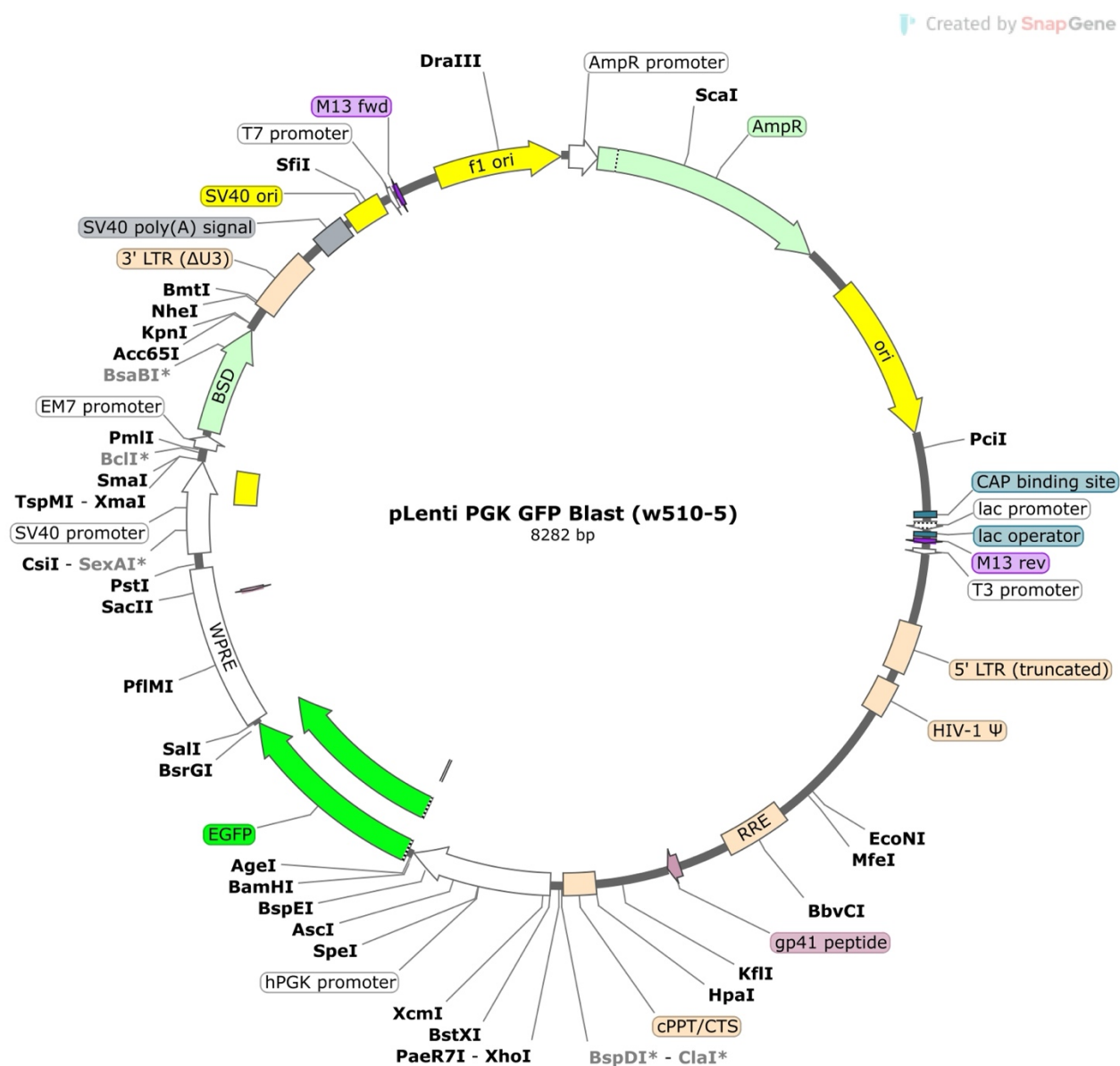


Рисунок 8. Полная карта лентивирусного вектора pLenti hPGK GFP.

## Получение лентивирусов

Трансферную плазмиду, плазмиду, кодирующую VSV-G, а также плазмиды, упаковывающие лентивирусы третьего поколения Gag-Pol и Rev (Life Science Marke, Китай), амплифицировали в стабильном штамме *E. coli* NEB (C3040I, New England Biolabs, США). Плазмиды выделяли с использованием набора для выделения плазмидной ДНК из бактериальных клеток (Plasmid-20 maxi) согласно инструкции производителя. Полученные плазмиды проверяли с помощью рестрикционного анализа и гель-электрофореза (рисунок 9).

Человеческие эмбриональные почечные клетки 293T (Human embryonic kidney 293T, HEK293T) использовали для сборки лентивирусов (рисунок 9). После размораживания клетки культивировали в культуральных флаконах площадью 75 см<sup>2</sup> T75 при начальной плотности  $1 \times 10^6$  клеток в 25 мл полной среды DMEM, дополненной 10 нмоль/мл HEPES, 600 нг/мл глутамина, 10 нг/мл гентамицина, 200 ЕД/мл бензилпенициллина, 350 пмоль/мл 2-меркаптоэтанола и 10% (v/v) FCS. После одного пассажа и достижения конfluence 70-90% площади колбы, клетки считали готовыми к трансфекции. Для отсоединения клеток от поверхности флакона использовали 10 мл раствора трипсина, состоящего из 0,1% трипсина в соотношении 1:3 с раствором ЭДТА. Процесс отслеживали под микроскопом, затем клетки собирали в пробирку Falcon объёмом 50 мл, промывали флакон 20 мл PBS, объединяя суспензию с основным объёмом. Далее клетки центрифугировали при 300 g в течение 8 мин, надосадочную жидкость удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл PBS и определяли концентрацию и жизнеспособность с помощью трипанового синего в камере Горяева, гарантируя, что для трансфекции использовались только клетки с жизнеспособностью, превышающей 90%.

Для подготовки к трансфекции  $2 \times 10^6$  клеток переносили в пробирку Eppendorf объёмом 1,5 мл. Параллельно в одной пробирке смешивали 150 мкл среды Opti-MEM (Gibco, США) и 8 мкл Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher, США), а в другой 150 мкл среды Opti-MEM и 10 мкг плазмид (по 2,5 мкг каждой: Gag-Pol, Rev, плазида, кодирующая VSV-G, и трансферная плазида). Смесь плазмид соединяли с раствором Lipofectamine 2000, инкубировали 5 минут при комнатной температуре, после чего добавляли к клеточной суспензии, перемешивали и инкубировали ещё 5 минут при комнатной температуре. Затем клетки переносили в чашку Петри диаметром 100 мм с 12 мл среды DMEM, содержащей HEPES, глутамин и 2-меркаптоэтанол. Антибиотики и FCS не добавляли, чтобы избежать ингибирования Lipofectamine. Клетки инкубировали 72 часа при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

После окончания инкубации собирали культуральную жидкость, содержащую вирусные частицы, и центрифугировали при 300 g в течение 8 минут для осаждения клеток. Полученную надосадочную жидкость переносили в пробирку с раствором для осаждения лентивируса TransLv™ (5×) (FV101-01, ТрансГен, Китай) в соотношении 4:1. Смесь перемешивали и оставляли на ночь при +4°C. На следующий день смесь центрифугировали при 1500 g в течение 45 минут при +4°C. Надосадочную жидкость аккуратно удаляли, оставляя на дне пробирки белый осадок, содержащий вирус. Осадок ресуспендировали в 0,5 мл холодного PBS и хранили при -150°C до дальнейшего использования.

### **Титрование лентивирусов**

Для титрования полученных лентивирусов использовали набор для qPCR-анализа лентивирусов TransLv™ (FV201-01, TransGen, Китай) в соответствии с инструкциями производителя. В качестве клеток-мишеней использовали НЕК293Т благодаря их высокой восприимчивости к трансдукции (рисунок 9).

Клетки НЕК293Т размораживали и готовили, как описано выше. После подсчёта и оценки жизнеспособности их переносили в 12-луночный планшет (TRP, Швейцария) с плотностью  $1 \times 10^5$  клеток на лунку. В каждую лунку добавляли по 100 мкл подготовленного лентивируса, доводя общий объём до 1 мл средой DMEM без FCS и антибиотиков. Клетки инкубировали 24 часа при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, затем планшет центрифугировали при 250 g в течение 8 минут. Среду из лунок удаляли и заменяли на 1 мл свежей среды DMEM без FCS и антибиотиков. После ещё 24 часов инкубации среду удаляли, клетки собирали, как описано ранее, и центрифугировали при 300 g в течение 8 минут. Клеточный осадок использовали для выделения ДНК с помощью набора GENOMIC DNA ISOLATION KIT (SKU 24700, Norgen Biotek, Канада) по инструкции производителя. Концентрацию ДНК измеряли с помощью прибора Qubit 4 с использованием набора dsDNA High Sensitivity (Thermo Fisher, США). Титр лентивируса определяли с использованием набора для qPCR-титрования TransLv™, согласно инструкции производителя.

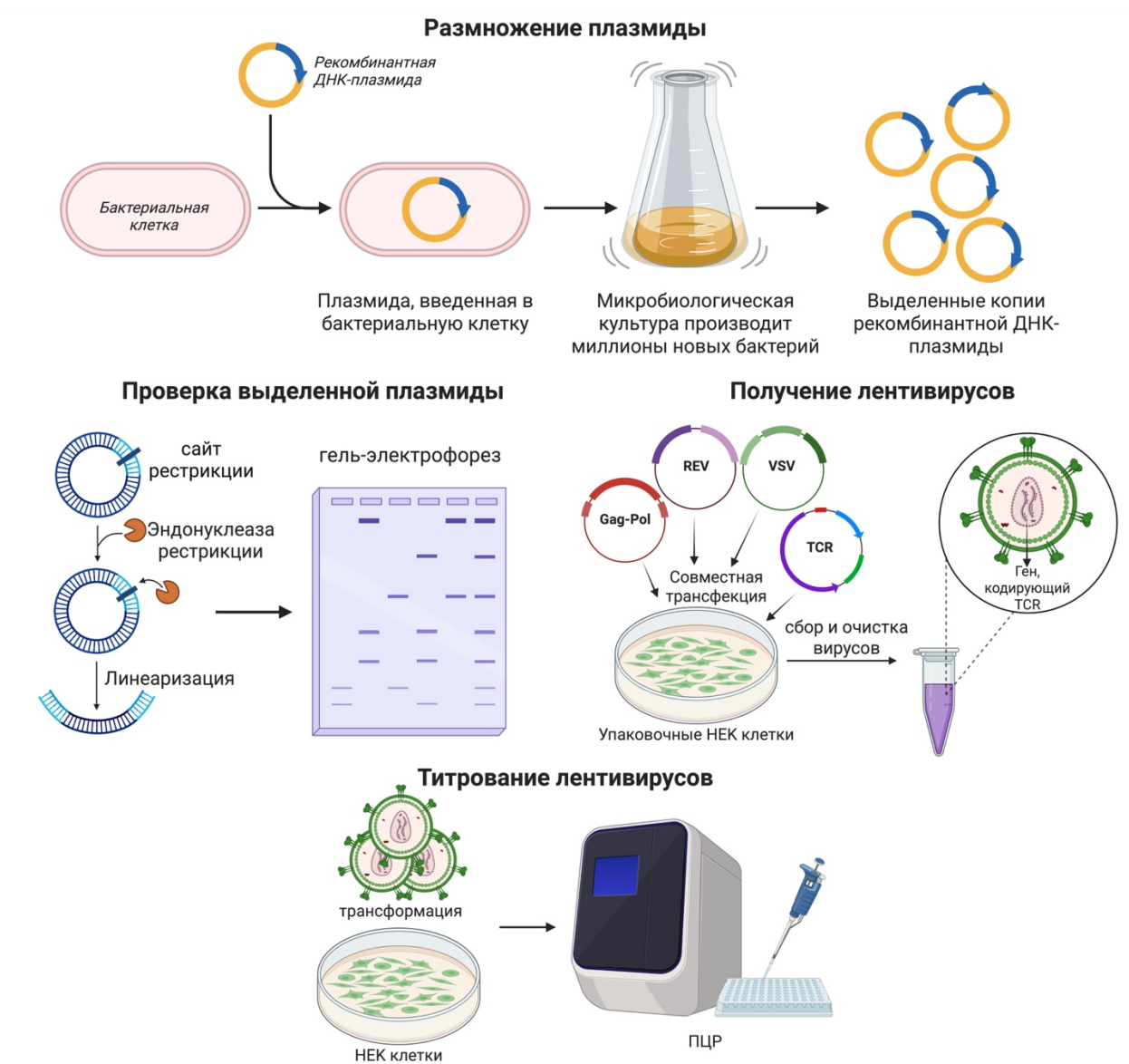


Рисунок 9. Схема экспериментальных стадий получения и титрования лентивирусов.

### 2.2.5. Производство HER2/неу-специфичных TCR-T-клеток

На 1-й день в рамках подготовки к трансдукции Fibronectin Fragment Human recombinant (аналог ретронектина) в концентрации 5 мкг/мл и антитела к CD3 в дозе 5 мкг/мл разводили в кислом растворе цитрат-декстрозы А (ACDA) и сорбировали в лунках 12-луночного планшета в объеме 415 мкл на лунку на ночь при +4°C. На 2-й день из периферической крови условно здоровых доноров выделяли МНК на градиенте фиколаурографина с последующим получением CD3<sup>+</sup> клеток методом негативной магнитной селекции с использованием набора Human CD3 T Cell Isolation Kit согласно инструкции производителя. Полученные CD3<sup>+</sup> клетки ресуспендировали в среде RPMI-1640 в концентрации  $7,5 \times 10^5$  клеток/мл и инкубировали в планшете с fibronectin Fragment Human recombinant (аналог ретронектина) и антителами против CD3 в присутствии IL-2 (300 ЕД/мл)

в объеме 2 мл на лунку в течение 48 часов. На 3-й день ретронектин в концентрации 5 мкг/мл в ACDA вновь сорбировали на поверхности новых лунок 24-луночного планшета по 255 мкл на лунку и оставляли на ночь. На 4-й день CD3+ клетки собирали, центрифугировали при 350 g в течение 10 минут, ресуспендировали в среде RPMI-1640 без добавления сыворотки и антибиотиков. В каждую лунку планшета с ретронектином добавляли по 500 мкл клеточной суспензии ( $5 \times 10^5$  клеток), с последующим добавлением лентивируса (при желаемой множественности инфекций (MOI)) и протамина сульфата в дозе 5-8 мкг/мл. Планшет центрифугировали при 600 g и 32°C в течение 2 часов. Затем в каждую лунку добавляли 500 мкл подогретой среды RPMI-1640 с IL-2 до конечной концентрации 300 ЕД/мл и инкубировали на ночь. На 5-й день клетки переносили в лунки 12-луночного планшета с добавлением IL-2 (300 ЕД/мл) и далее культивировали, обновляя среду каждые два дня с добавлением свежего IL-2. Эффективность трансдукции затем оценивали через 5 дней с помощью технологии Flex-T.

#### **2.2.6. Оценка цитотоксичности TCR-T-клеток *in vitro***

Для оценки цитотоксической активности TCR-T-клеток опухолевые клетки в фазе логарифмического роста снимали с поверхности культурального флакона смесью 0,25% трипсина и раствора Версена в соотношении 1:3. Собранные клетки высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном по 5000 клеток на лунку. Через 2–3 часа добавляли трансдуцированные и нетрансдуцированные Т-клетки в количестве 50 000 клеток на лунку, что соответствовало отношению эффектор:мишень 10:1. Совместное культивирование проводили 16–18 часов в среде с 5% FCS.

За 45 минут до завершения инкубации в контрольные лунки (опухолевые клетки) вносили по 10 мкл 10× лизирующего раствора на 100 мкл среды для оценки максимального высвобождения ЛДГ. По окончании инкубации планшеты центрифугировали (250×g, 4 мин), после чего культуральную жидкость переносили по 50 μл в новый 96-луночный планшет, добавляли 50 мкл восстановленной фермент-субстратной смеси ЛДГ, инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте. Реакцию останавливали добавлением 1 М уксусной кислоты, измеряя оптическую плотность при 490 или 492 нм. Цитотоксичность рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ цитотоксичности} = 100 \times (\text{OD}[\text{T-клетки} + \text{мишень}] - \text{OD}[\text{T-клетки}]) / (\text{OD}[\text{максимальный лизис}] - \text{OD}[\text{спонтанный лизис}])$$

Анализ данных проводили в GraphPad Prism 10.2.3, используя критерий Крускала–

Уоллиса с поправкой Данна для множественных сравнений.

## 2.2.7. Анализ транскриптома

### Совместное культивирование и подготовка образцов

Опухолевые клетки отделяли смесью растворов трипсина/Версена (1:3), высевали в 96-луночные планшеты (40 000 клеток на лунку). Через 4-5 часов добавляли TCR-T-клетки (400 000 клеток на лунку, E:T=10:1) и инкубировали 16–18 часов в среде с 5% FCS. Затем TCR-T-клетки аккуратно собирали пипетированием. Возможное загрязнение погибшими или отделившимися опухолевыми клетками учитывали при анализе.

TCR-T-клетки инкубировали 20 мин при комнатной температуре с антителами-метками из набора для мультиплексирования BD™ Single-Cell Multiplexing Kit. После трех промывок клетки окрашивали кальцеином по инструкции к системе BD Rhapsody. Жизнеспособные кальцеин-позитивные клетки подсчитывали на Attune NxT.

Далее клетки объединяли в равных долях, ресуспендировали в холодном буфере до концентрации 10 клеток/мкл (общий объем 620 мкл) и загружали в картридж BD Rhapsody. Количество нагруженных клеток оценивали визуально на In Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare, США) как среднее число кальцеин-позитивных клеток на 5 полях зрения, деленное на 175 и умноженное на 200 000.

### Подготовка библиотек кДНК и секвенирование

Обработку клеток и подготовку библиотек выполняли с использованием BD Rhapsody по инструкциям производителя (Targeted mRNA, Sample Tag, BD AbSeq protocols). Анализ экспрессии выполняли с помощью панели BD Rhapsody™ Onco-BC Panel HS.

После лизиса клеток на магнитных шариках проводили обратную транскрипцию мРНК и Sample Tags, затем амплификацию на шариках (PCR1) с последующим разделением продуктов PCR1 (мРНК и Tag) и очисткой AMPure XP. Далее выполняли PCR2, очищали продукты, определяли концентрацию с помощью Qubit 4, нормализовали до 5,5 нг/мкл (мРНК) и 3,0 нг/мкл (Sample Tag) для финальной амплификации с индексами Illumina. Готовые библиотеки объединяли (соотношение мРНК/Sample Tag 94/6%) до 5 нМ, и секвенировали в компании «Альгавитапро» (Москва, Россия) на платформе NovaSeq 6000 (Illumina, США) с использованием проточной ячейки SP в режиме парноконцевых чтений (R1 = 51 цикл, R2 = 51 цикл) с выходом около 700 млн считываний.

## **Обработка данных секвенирования**

FASTQ-файлы обрабатывали с использованием BD Rhapsody pipeline v2.0 (BD Biosciences, США). Фильтрацию по качеству выполняли по длине чтения, среднему качеству и однонуклеотидной частоте. В R1 выделяли клеточные баркоды и UMI, в R2 выравнивали к BD Rhapsody™ Onco-BC Panel HS с помощью Bowtie2. Дедупликацию UMI выполняли с использованием RSEC и DBEC. Число клеток определяли методом второй производной. Демультимплексирование и фильтрацию мультиплетов осуществляли по Sample Tags. На выходе формировали матрицы экспрессии генов по образцам. Достигнута высокая насыщенность и глубина секвенирования.

### **2.2.8. Анализ секретома**

#### **Культивирование клеток**

Клетки линии SK-Mel-37 высевали по 10 000 клеток на лунку. Через 2–3 часа добавляли трансдуцированные Т-клетки (100 000 на лунку) в 96-луночный планшет. Совместное культивирование проводили 16–18 часов в среде RPMI-1640 с 5% CO<sub>2</sub>. Затем планшет центрифугировали (1500 об/мин, 10 мин), надосадочную жидкость собирали в пробирки, и хранили при –80°C до дальнейшего использования.

#### **Определение концентраций цитокинов**

Измерение проводили с использованием панели LegendPlex Human CD8/NK по инструкции производителя. Вкратце, 25 мкл образца инкубировали с захватывающими частицами, детектирующими антителами и стрептпвидином, конъюгированным с PE. Анализ проводили с помощью проточного цитометра Attune NXT. Данные нормализовали в log<sub>2</sub> с помощью Pandas, дифференциальную продукцию оценивали множественными Т-тестами с коррекцией FDR. Значимость устанавливали при изменении кратности > 1 или < -1 и q < 0,05. Вулкан-плоты строили в GraphPad Prism 10.2.3, тепловые карты с использованием Bioinfokit.

### **2.2.9. Оценка терапевтического потенциала TCR-T-клеток *in vivo***

Иммунодефицитные мыши линии SCID (Severe Combined Immunodeficient) использовались для моделирования ксенотрансплантатов опухолей человека. Животные были получены и содержались в виварии Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия). Самцы и самки в возрасте 8 недель со статусом SPF содержались отдельно по полу группами по 2–5 особей в индивидуально

вентилируемых клетках (IVC, система OptiMice, Animal Care Systems). Условия содержания поддерживались при температуре 21–24 °С, относительной влажности 30–50% и режиме освещения 12/12 часов (включение света в 02:00). Животные имели свободный доступ к корму Ssniff (Германия) и воде, очищенной методом обратного осмоса и дополнительно обогащённой минеральной смесью.

Клетки линии SK-MEL-37 размораживали за 2–3 недели до начала эксперимента и культивировали в течение 4–5 пассажей в полной культуральной среде RPMI-1640, дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки, при 37 °С в культуральных флаконах для получения необходимого количества клеток. В день трансплантации клетки отделяли раствором трипсин/версен, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут и ресуспендировали в среде без сыворотки. Для формирования ксенотрансплантатов подкожно в область правого плеча вводили 100 мкл ( $5 \times 10^6$  клеток) клеточной суспензии.

Терапию начинали через 7 дней после инокуляции опухолевых клеток, когда средний объём опухоли достигал приблизительно 100 мм<sup>3</sup>. Животные были распределены на три группы: экспериментальную (введение TCR-T-клеток, специфичных к HER2/neu), контрольную с введением нетрансдуцированных T-клеток и контрольную без лечения. Трансдуцированные и нетрансдуцированные T-клетки вводили однократно локально в область сформированного опухолевого узла в объёме 100 мкл ( $10 \times 10^6$  клеток). Мониторинг роста опухоли проводили в течение 45 суток.

Все процедуры выполнялись в соответствии с принципами гуманного обращения с животными, изложенными в директиве Европейского сообщества 86/609/ЕЕС. Протоколы экспериментов были одобрены Комитетом Института фундаментальной и клинической иммунологии (на заседании № 139 от 30.05.2022). Состояние животных оценивали каждые 2–3 дня с контролем состояния кожных покровов, двигательной активности и поведенческих изменений. Объём опухоли измеряли штангенциркулем при каждом осмотре и рассчитывали по формуле:  $V = a \times b^2 \times 0,52$ , где  $a$ : длина опухоли,  $b$ : её ширина.

Критериями досрочной эвтаназии служили признаки выраженной токсичности (сутулость, снижение активности), потеря массы тела более 20% или чрезмерное увеличение объёма ксенотрансплантата. Плановую эвтаназию проводили по окончании 45-дневного периода наблюдения или ранее при необходимости методом передозировки CO<sub>2</sub> с последующей цервикальной дислокацией.

## Глава 3. Результаты

Разработка Т-клеточной терапии с использованием Т-клеточных рецепторов (TCR-T), нацеленной на эпитопы HER2/neu при HER2-позитивном раке, 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 10).

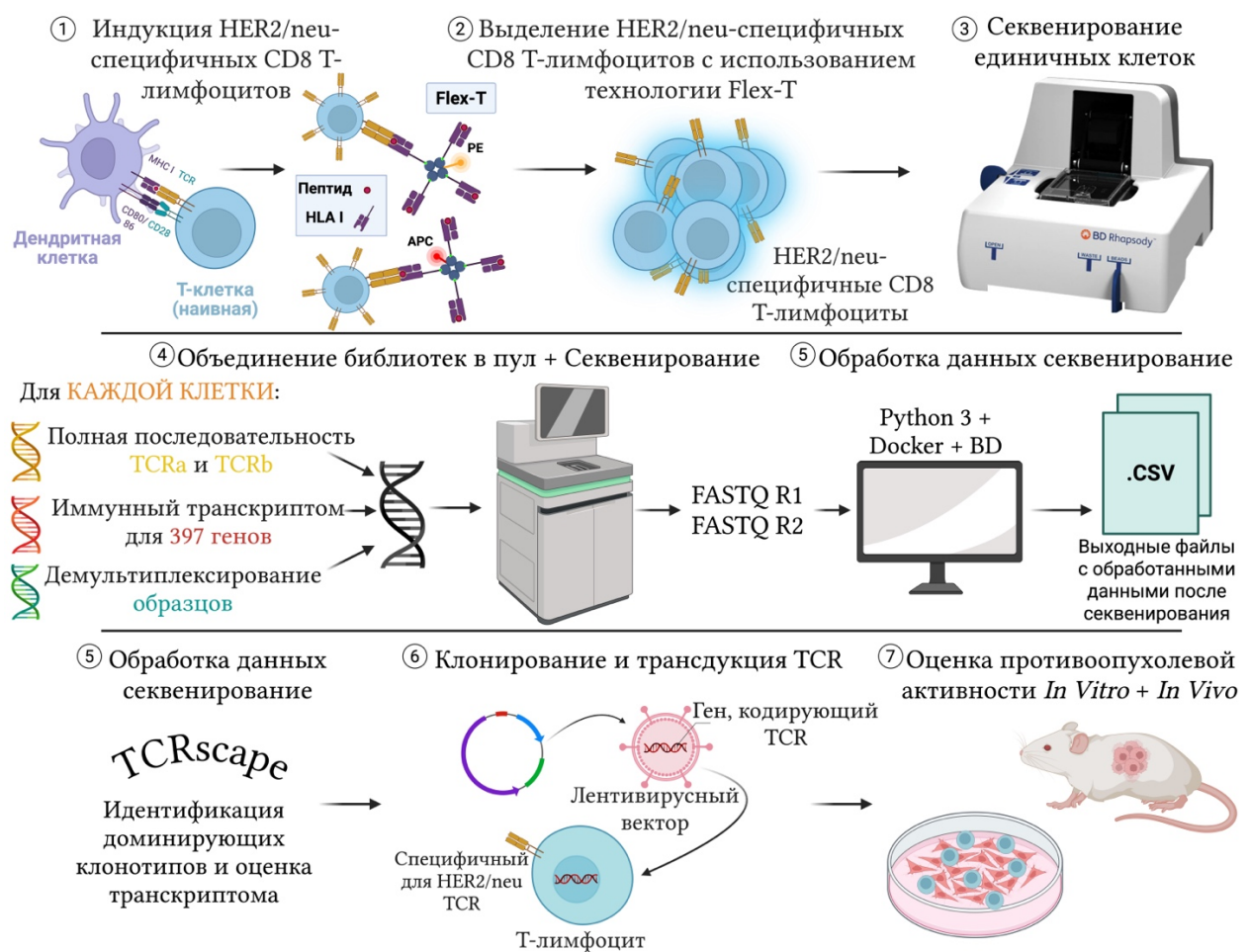


Рисунок 10. Общая схема ключевых этапов работы.

### 3.1. Клонирование Т-клеточных рецепторов специфичных к эпитопу HER2

#### 3.1.1 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 [211,212], 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* [46,257], дополнительно обосновала его выбор в качестве мишени для распознавания HER2-позитивных раковых клеток иммунной системой.

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 фиколлаурографина, что является стандартным подходом для получения высокоочищенных лимфоцитарных фракций. Учитывая низкую частоту KIF-специфичных Т-клеток в естественном репертуаре, был разработан многоэтапный 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 11): клетки-предшественники культивировали в присутствии GM-CSF и IL-4 с последующей нагрузкой пептидом KIF и индукцией созревания TNF- $\alpha$ . Параллельно CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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 [258]. 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), добиваясь существенной клональной экспансии.

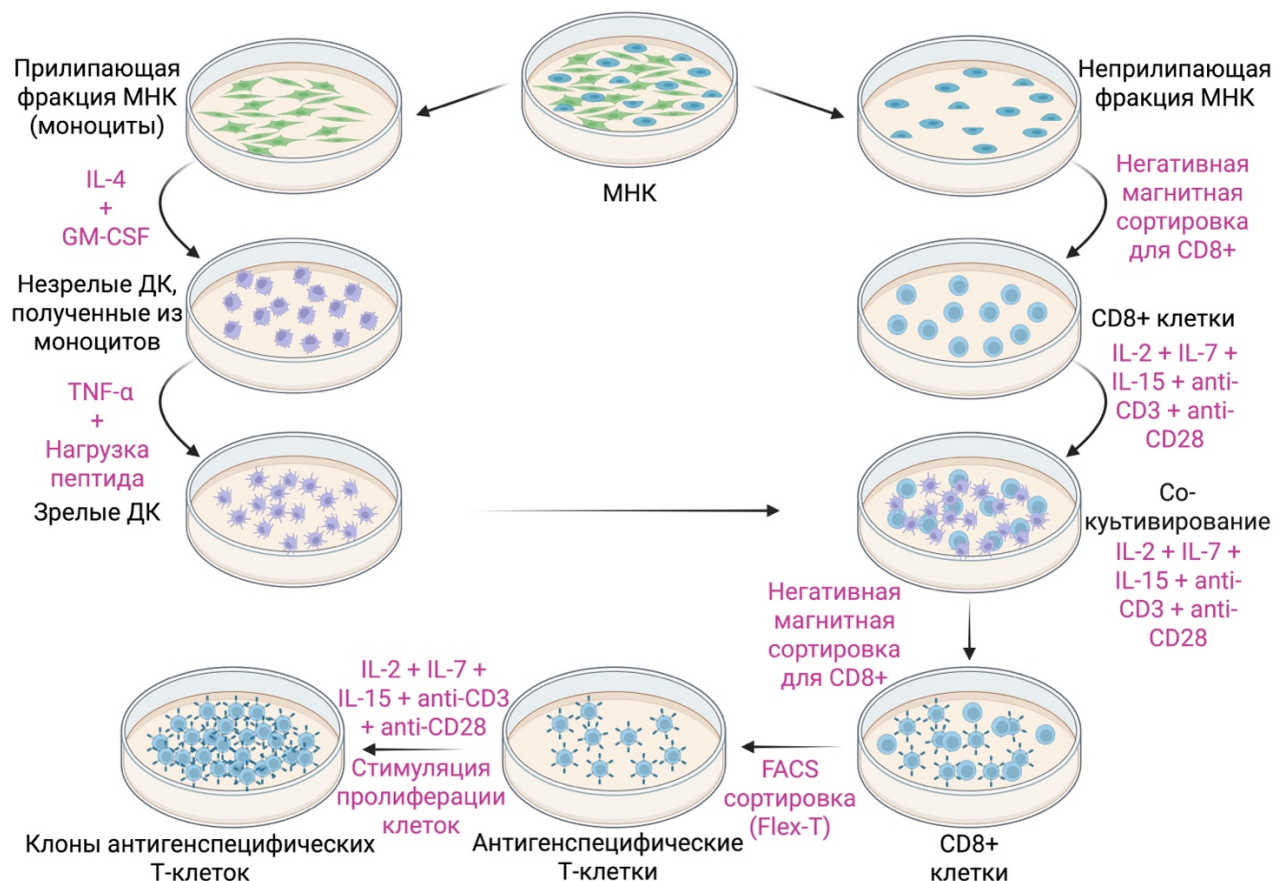


Рисунок 11. Схема разработанного протокола индукции антигенспецифических Т-цитотоксических лимфоцитов *in vitro*. МНК: моноклеарные клетки периферической крови; ДК: дендритные клетки.

Разработанный протокол позволил увеличить долю KIF-специфичных Т-клеток в лимфоцитарной популяции более чем в 200 раз (рисунок 12). Конечный выход антигенспецифичных клеток варьировал среди доноров от 1,0% до 8,7% от общего пула лимфоцитов, что достаточно для эффективной сортировки. После процедуры чистота выделенных антиген-специфичных клеток составляла 50–68%, а их общее количество на донора 25 000 – 170 000 клеток, обеспечивая надежную основу для последующих этапов.

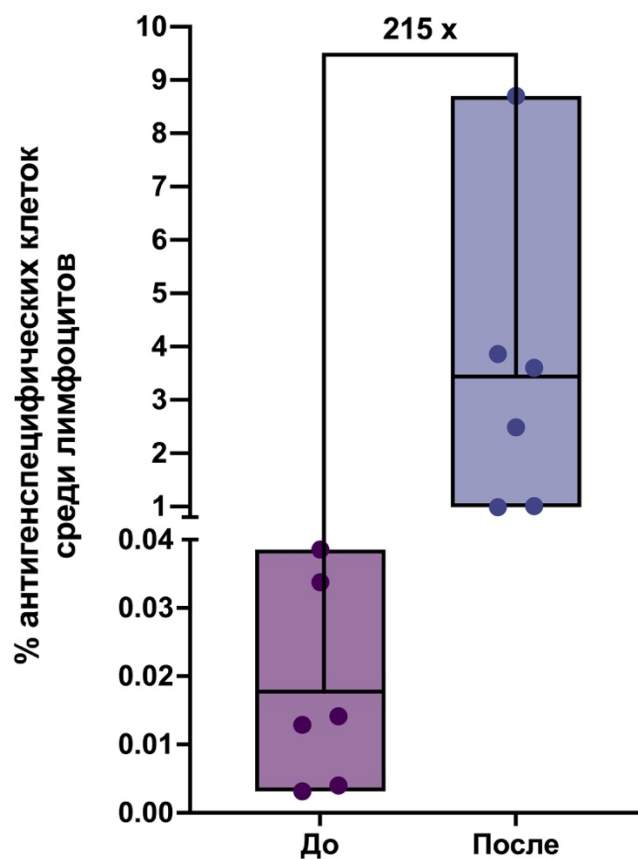


Рисунок 12. Процентное содержание антиген-специфических Т-клеток среди лимфоцитов у доноров до и после применения протокола индукции (n = 6). Горизонтальная линия соответствует среднему значению.

Таким образом, многоэтапный протокол (отбор доноров, генерация ДК, прайминг Т-клеток, антиген-специфическая селекция) позволил получить высокоочищенную популяцию HER2-специфичных Т-клеток. Данные клетки являются ключевым ресурсом для получения антиген-специфических TCR-T клеток, направленных против HER2-позитивного рака, обеспечивая основу для разработки эффективной Т-клеточной иммунотерапии.

### 3.1.2 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/neu. Данный этап имел критическое значение для точного определения TCR, способных эффективно направлять Т-клетки к опухолевым клеткам, высоко-экспрессирующим HER2.

Исследование начали с анализа иммунного транскриптома и репертуара TCR 18 000 HER2-специфичных CD8<sup>+</sup> 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 [259,260] (рисунок 6). 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(А)-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 переменных доменах TCR в двухцепочечную 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 переменных доменов TCR. Это позволило сохранить

целостность генетической информации о  $\alpha$ - и  $\beta$ -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 комплексную 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 [261]. В качестве референсной базы выбрали McPAS-TCR ресурс, содержащий >40 000 аннотированных TCR-последовательностей, ассоциированных с антигенами при патологиях, включая рак [255]. В отличие от аналогов, предсказывающих специфичность только по CDR3 $\beta$ , ERGO-II анализирует полный набор параметров: CDR3 $\alpha$ , CDR3 $\beta$ , V/J-сегменты, последовательность пептида, тип HLA и тип T-клеток, что повышает точность прогноза [261].

Во-вторых, для проведения углубленного анализа идентифицированных клонотипов с учетом их транскриптомного профиля, мы использовали программный инструмент TCRscape [262], 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 таргетной 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 13).

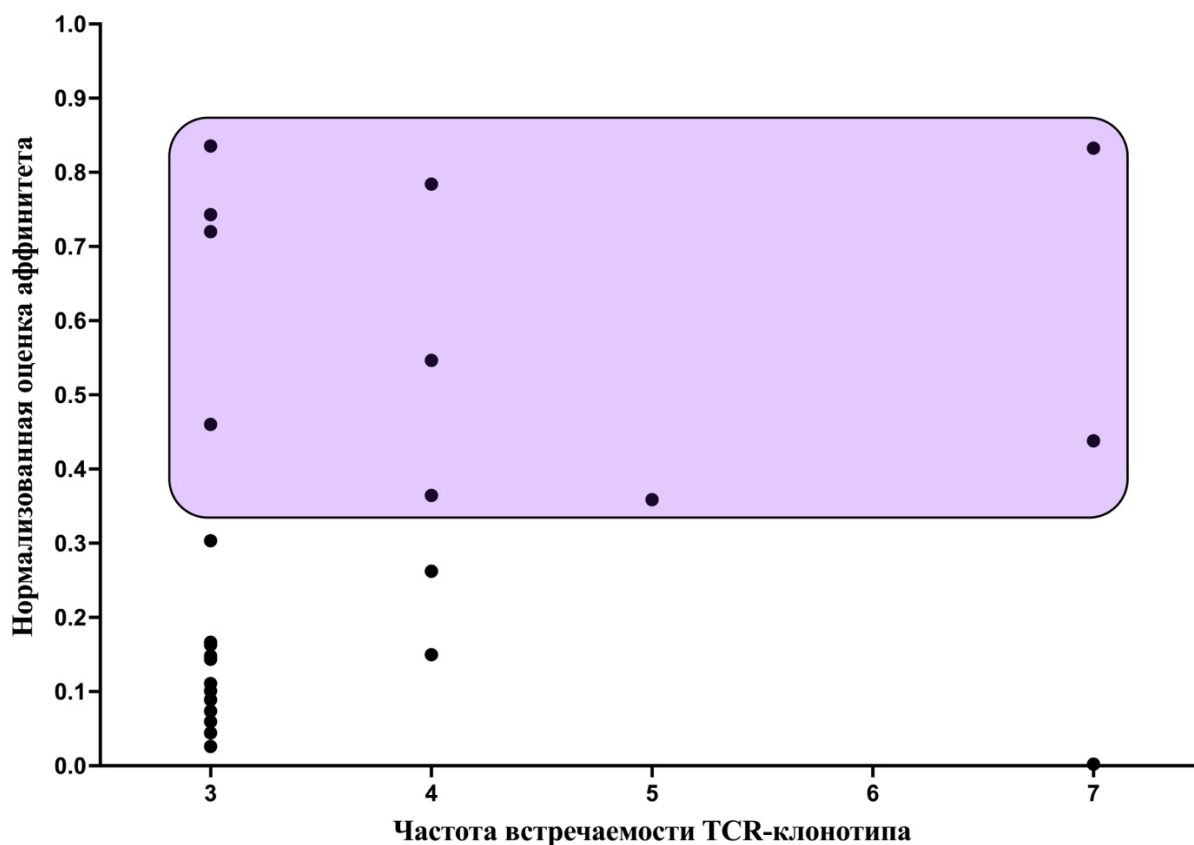


Рисунок 13. Стратегия отбора перспективных TCR-кандидатов на основе частоты их встречаемости и прогностической оценки аффинитета. Выделенная область соответствует клонотипам, представляющим интерес для дальнейших исследований.

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 14), что указывает на мощную эффекторную функцию, направленную на уничтожение опухолевых клеток. Эта кластеризация подтвердила функциональную значимость выбранного клонотипа, приведя его молекулярный профиль в соответствие с желаемыми терапевтическими свойствами.

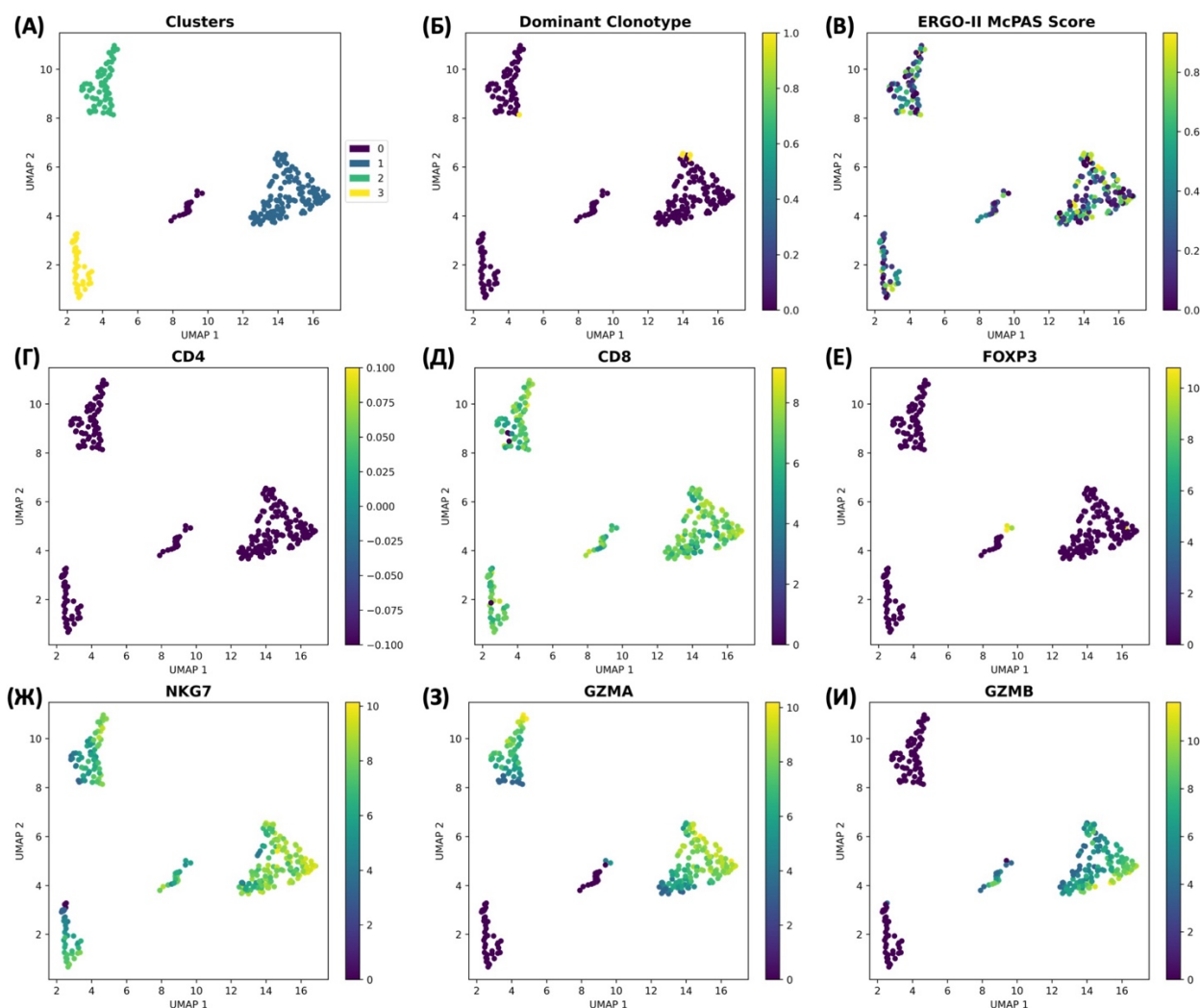


Рисунок 14. Анализ клонотипов и транскриптома антиген-специфических Т-клеток с использованием инструмента TCRscape: (А) Кластеры, идентифицированные методом HDBSCAN; (Б) Распределение клеток экспрессирующих доминантный клонотип; (В) Предсказанная аффинность связывания (ERGO-II); (Ж–И) Уровни экспрессии маркерных генов. Цветовая шкала: желтый максимальная экспрессия, фиолетовый минимальная.

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.

Еще важно подчеркнуть, что при анализе последовательностей области, определяющей комплементарность 3 (Complementarity-Determining Region 3, CDR3), обнаружено, что доминирующая альфа-бета пара CDR3 присутствовала в 21 клетке (рисунок 15), но только 7 из них соответствовали ведущему клонотипу TCR. Остальные клетки содержали менее частые клонотипы, каждый из которых был представлен двумя клетками, что указывает на ограниченность использования только последовательностей CDR3 для определения специфичности TCR. Это подтвердило ключевую роль переменных (V) и соединительных (J) генных сегментов в формировании взаимодействий TCR-пептид-HLA, отражая сложность динамики связывания [263,264].

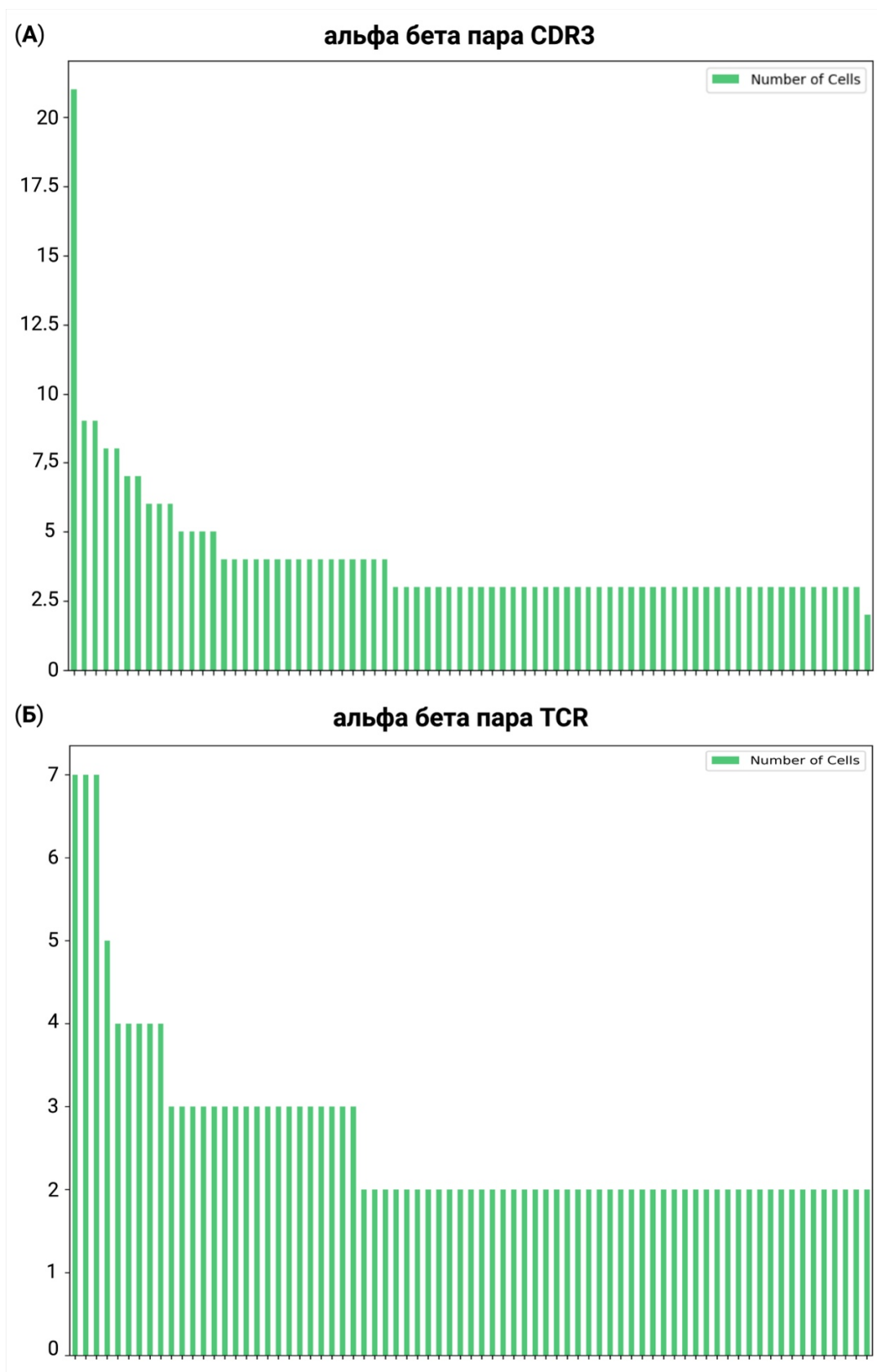


Рисунок 15. Сравнение распределения клонотипов TCR на основе анализа (А) парных последовательностей CDR3-петля и (Б) полноразмерных последовательностей TCR. Каждый столбец на графиках соответствует индивидуальному клонотипу, клонотипы ранжированные по убыванию частоты встречаемости.

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

Следующими шагами были дизайн и конструирование лентивирусной трансферной плазмиды, кодирующей ведущий TCR. Этот процесс начался с использования данных секвенирования мРНК единичных клеток для получения последовательности ведущего клонотипа TCR, за которым последовала разработка плазмиды, оптимизированной для эффективной экспрессии TCR. Затем мы амплифицировали эту плазмиду вместе с плазмидой, кодирующей VSV-G, и плазмидами-упаковщиками лентивирусов третьего поколения (Gag-Pol и Rev) в компетентных бактериях для получения достаточных количеств, продуцировали лентивирусы третьего поколения в клетках HEK293T и титровали полученные вирусные частицы, чтобы обеспечить адекватную эффективность трансдукции. Эти шаги имели решающее значение для создания надежной системы доставки для введения HER2-специфичного TCR в Т-клетки.

### 3.2.1 Дизайн плазмиды

В результате наших усилий по секвенированию единичных клеток мы идентифицировали последовательность ведущего клонотипа TCR, характеризующегося высокой аффинностью связывания и распространенностью среди клонотипов. Чтобы сконструировать трансферную лентивирусную плазмиду, кодирующую этот TCR, мы сначала оптимизировали последовательности альфа- (TCR $\alpha$ ) и бета- (TCR $\beta$ ) цепей TCR, используя инструмент оптимизации кодонов ExpOptimizer. Этот веб-инструмент использует комплексный алгоритм, который регулирует использование кодонов в соответствии с трансляционным механизмом организма-хозяина, в данном случае *Homo sapiens*, 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 [265]. 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 $\alpha$  и TCR $\beta$  были собраны в единую рамку считывания, разделив их саморасщепляющимся пептидом P2A, что обеспечило совместную экспрессию обеих цепей из единого транскрипта мРНК (рисунок 16). Пептид P2A, функционирующий за счет механизма саморасщепления в процессе трансляции,

позволяет независимо синтезировать  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи TCR в эквимольных соотношениях, что важно для правильной сборки TCR [266]. Кроме того, фланкирующие вставку 5'- и 3'-нетранслируемые области (UTR) гена  $\beta$ -глобина человека, известные своей способностью повышать стабильность мРНК и эффективность трансляции, были включены в конструкцию. Эти UTR стабилизируют транскрипт и усиливают рекрутирование рибосом, что обеспечивает стабильную экспрессию TCR в генетически модифицированных Т-клетках, что критически важно для поддержания длительного терапевтического эффекта [267–271].

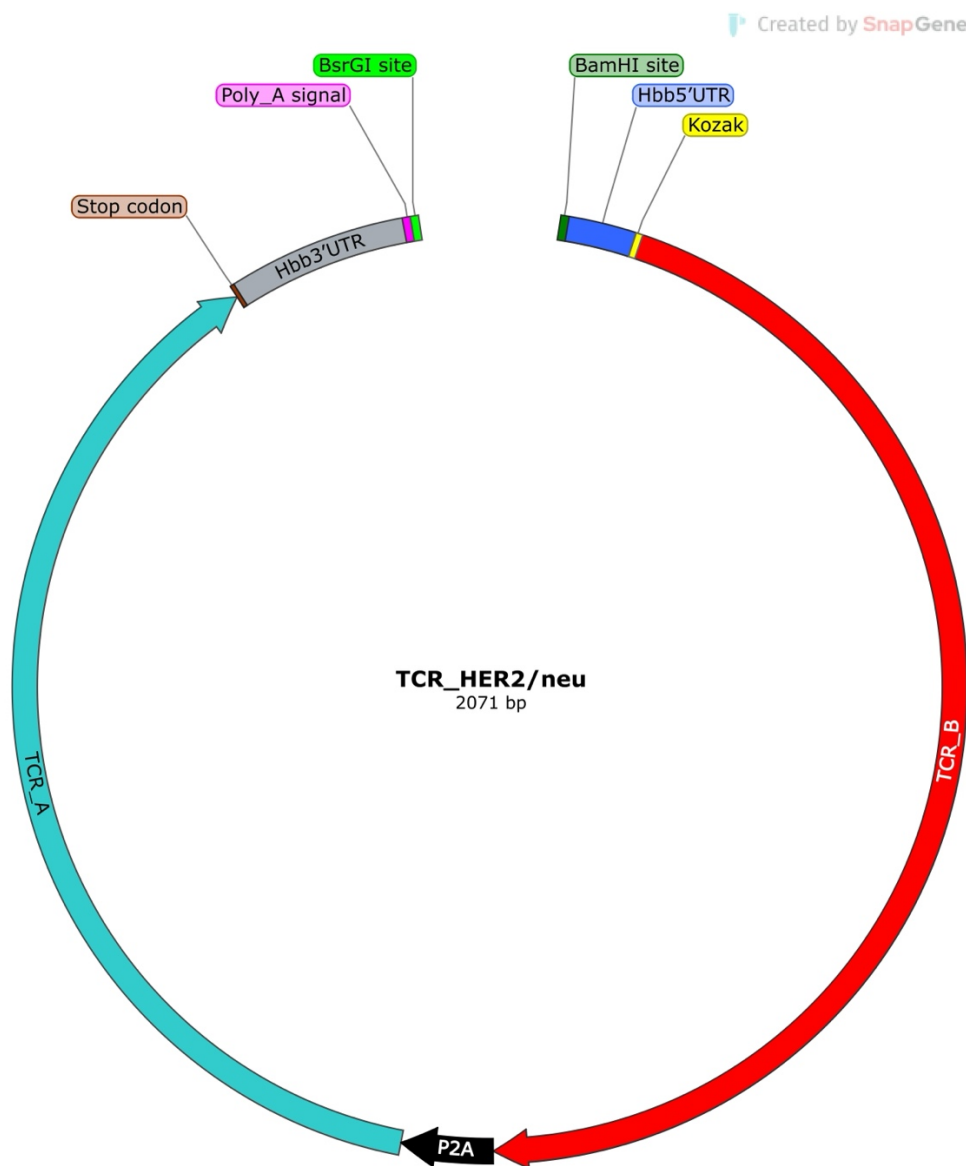


Рисунок 16. Схематическая карта подготовленной вставки для клонирования в трансферный лентивирусный вектор. Представлена структура вставки, включающая последовательности  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей TCR, разделенные саморасщепляющимся пептидом P2A. Указаны регуляторные элементы (Kozak, Hbb-UTR) и фланкирующие сайты рестрикции BamHI/BsrGI.

Трансферная лентивирусная плаزمида была сконструирована на основе плазмиды ВИЧ-1 рLenti hPGK GFP (рисунок 8), 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 (PGK), обеспечивающего конститутивную экспрессию трансгена в гемопоэтических клетках.

Успешная конструкция этой плазмиды с оптимизированными для кодонов последовательностями TCR, P2A-опосредованной коэкспрессией и  $\beta$ -глобиновыми UTR для повышения стабильности создает надежную платформу для получения HER2-специфичных TCR-T-клеток, решая ключевые проблемы, связанные с экспрессией и стабильностью TCR.

### 3.2.2 Сборка и титрование вирусов

Трансферную лентивирусную плазмиду (кодирующую TCR), вместе с плазмидой, кодирующей VSV-G, и плазмидами-упаковщиками лентивирусов третьего поколения (Gag-Pol и Rev) амплифицировали в клетках *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . 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 плаزمида, Gag-Pol, Rev и VSV-G, что минимизирует риск образования лентивируса, способного к репликации, благодаря необходимости множественных рекомбинационных событий между отдельными плазмидами [272]. 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 [270]. Эти особенности делают лентивирусы третьего поколения оптимальными для стабильной и безопасной доставки генов в неделящиеся клетки, такие как Т-лимфоциты. Плазмида 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 [273,274].

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 TransL<sup>v</sup><sup>TM</sup> Lentivirus Precipitation Solution (5×), основанного на полимерной преципитации. Этот метод заключается в смешивании раствора с содержащей вирус культуральной жидкостью, последующей инкубацией для осаждения вирусных частиц и центрифугирования, 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 трансген 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 (рисунок 9).

### **3.3. Получение TCR-Т клеток специфичных к HER2/неу**

#### **3.3.1 Оптимизация MOI**

Чтобы оптимизировать трансдукцию для терапевтического применения, мы провели пилотный эксперимент по определению оптимальной множественности инфекции (Multiplicity Of Infection (MOI)) для CD3<sup>+</sup> Т-клеток, направленный на достижение максимальной эффективности трансдукции при сохранении жизнеспособности клеток, что является необходимым требованием для масштабируемого и воспроизводимого производства TCR-Т-клеток. MOI, определяется как отношение количества инфекционных лентивирусных единиц к числу клеток-мишеней [275]. 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, что важно для терапевтических Т-клеточных продуктов. 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 [276].

В эксперименте CD3<sup>+</sup> 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 значимо варьировала (рисунок 17). Наибольшая эффективность 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-Т-клеток.

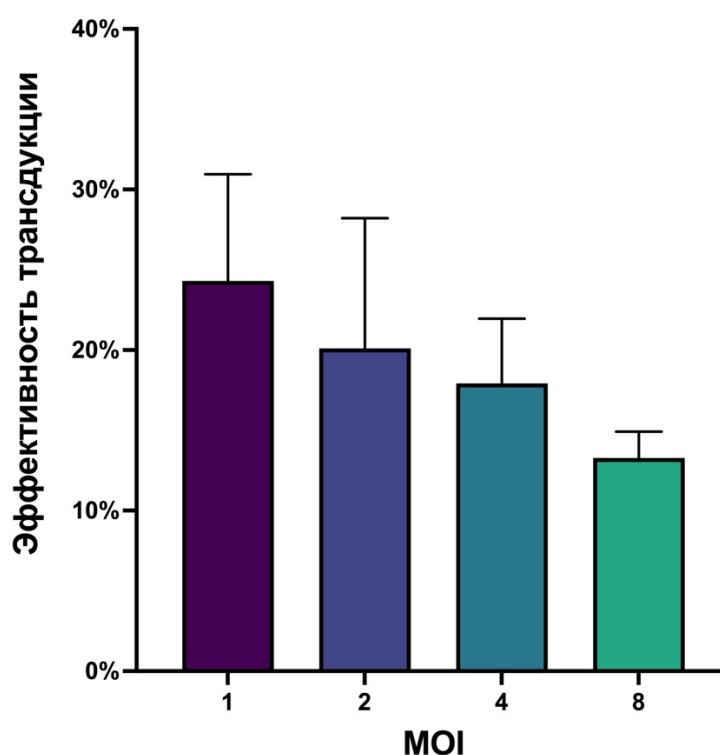


Рисунок 17. Анализ эффективности трансдукции Т-лимфоцитов лентивирусным вектором при различных значениях множественности инфекции MOI (n = 4). Данные представлены в виде среднего значения ± SD.

### 3.4. Функциональные и молекулярные характеристики генетически модифицированных TCR-Т-клеток

Чтобы подтвердить эффективность сконструированных TCR-Т-клеток, нацеленных на эпитоп HER2 KIF, мы провели обширную функциональную характеристику. Оценивали

противоопухолевую активность с помощью анализов цитотоксичности *in vitro* и оценки терапевтического потенциала TCR-T-клеток *in vivo*, профилировали секрецию цитокинов и эффекторных молекул, а также выполнили транскриптомный анализ с целью выявления молекулярных сигнатур. Эти исследования подтвердили специфичность TCR, цитотоксическую активность и терапевтический потенциал, продемонстрировав избирательное воздействие на опухолевые клетки с повышенной экспрессией HER2 при минимальной реактивности в отношении нормальных клеток, что соответствует ключевым критериям для клинического применения.

#### **3.4.1 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 четырьмя линиями раковых клеток, экспрессирующими HER2/neu на разных уровнях, что подтверждено методом проточной цитометрии (рисунок 18): 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.

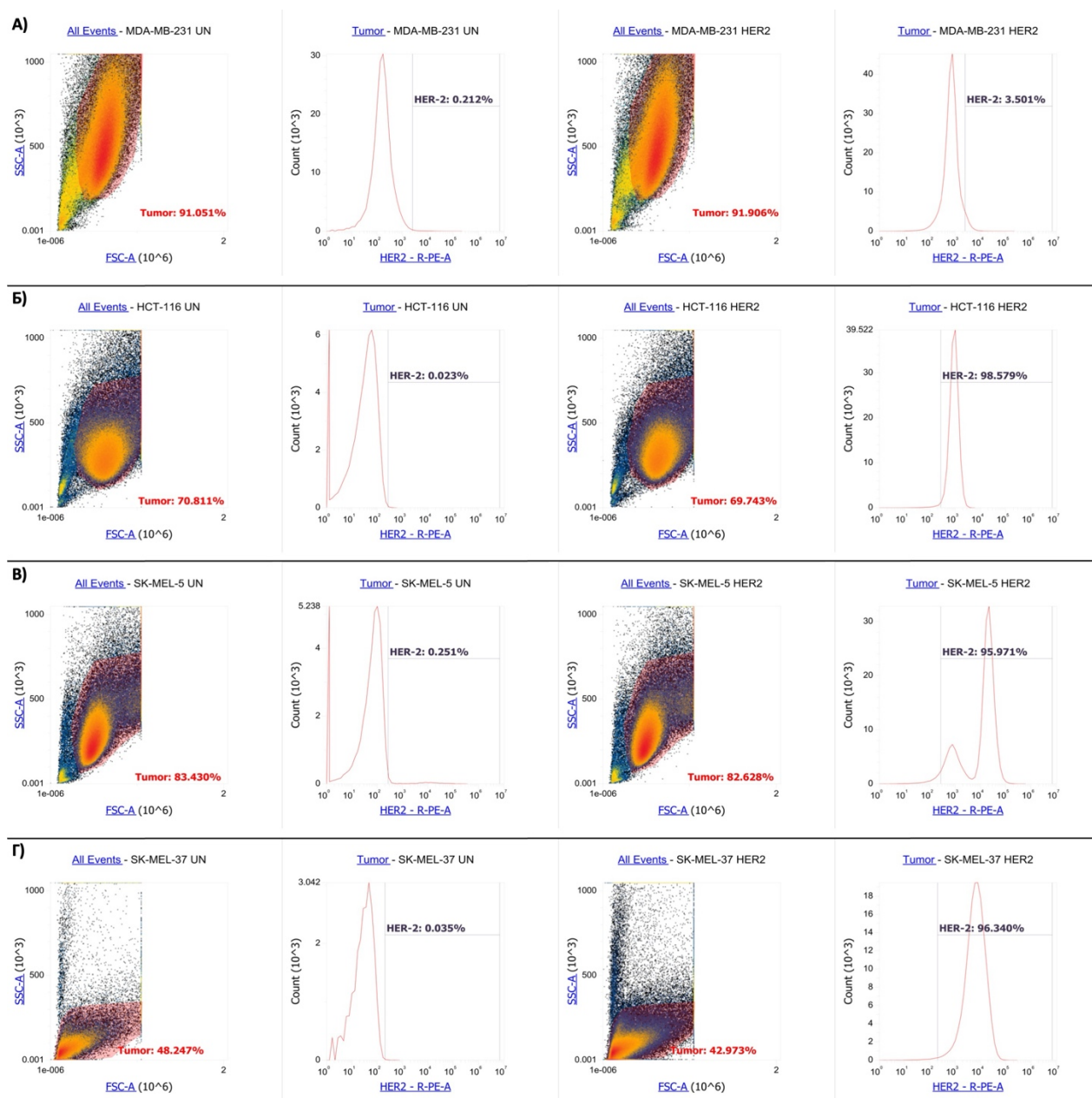


Рисунок 18. Верификация поверхностной экспрессии антигена HER2 на панели опухолевых клеточных линий методом проточной цитофлуориметрии. Представлены данные для линий: А) MDA-MB-231, Б) HCT-116, В) SK-MEL-5 и Г) SK-MEL-37. Каждая панель включает точечные диаграммы всех зарегистрированных событий и соответствующие гистограммы, отражающие уровень экспрессии HER2/neu в неокрашенных образцах (UN) и в образцах, окрашенных антителами к HER2/neu (HER2). Указан процент HER2/neu-положительных опухолевых клеток.

Цитотоксичность оценивали по высвобождению лактатдегидрогеназы (ЛДГ), стабильного цитоплазматического фермента, выделяющегося в культуральную среду при повреждении клеточной мембраны, что приводит к гибели клеток [277]. В нашем эксперименте высвобождение ЛДГ из лизированных опухолевых клеток служило прямым

показателем цитотоксичности, опосредованной TCR-T-клетками, отражая способность TCR распознавать HER2 и активировать эффекторные функции T-клеток. Чувствительность анализа позволила выявить незначительные различия в цитотоксичности между клеточными линиями с варьирующим уровнем экспрессии HER2, что позволило надежно оценить антиген-специфическую активность TCR. В отличие от анализа, основанного на пролиферации или жизнеспособности, анализ ЛДГ конкретно определяет гибель клеток-мишеней без вмешательства пролиферации T-клеток, что делает его идеальным для оценки взаимодействия эффектора и мишени [278].

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 T-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 19). 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 T-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-T-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.

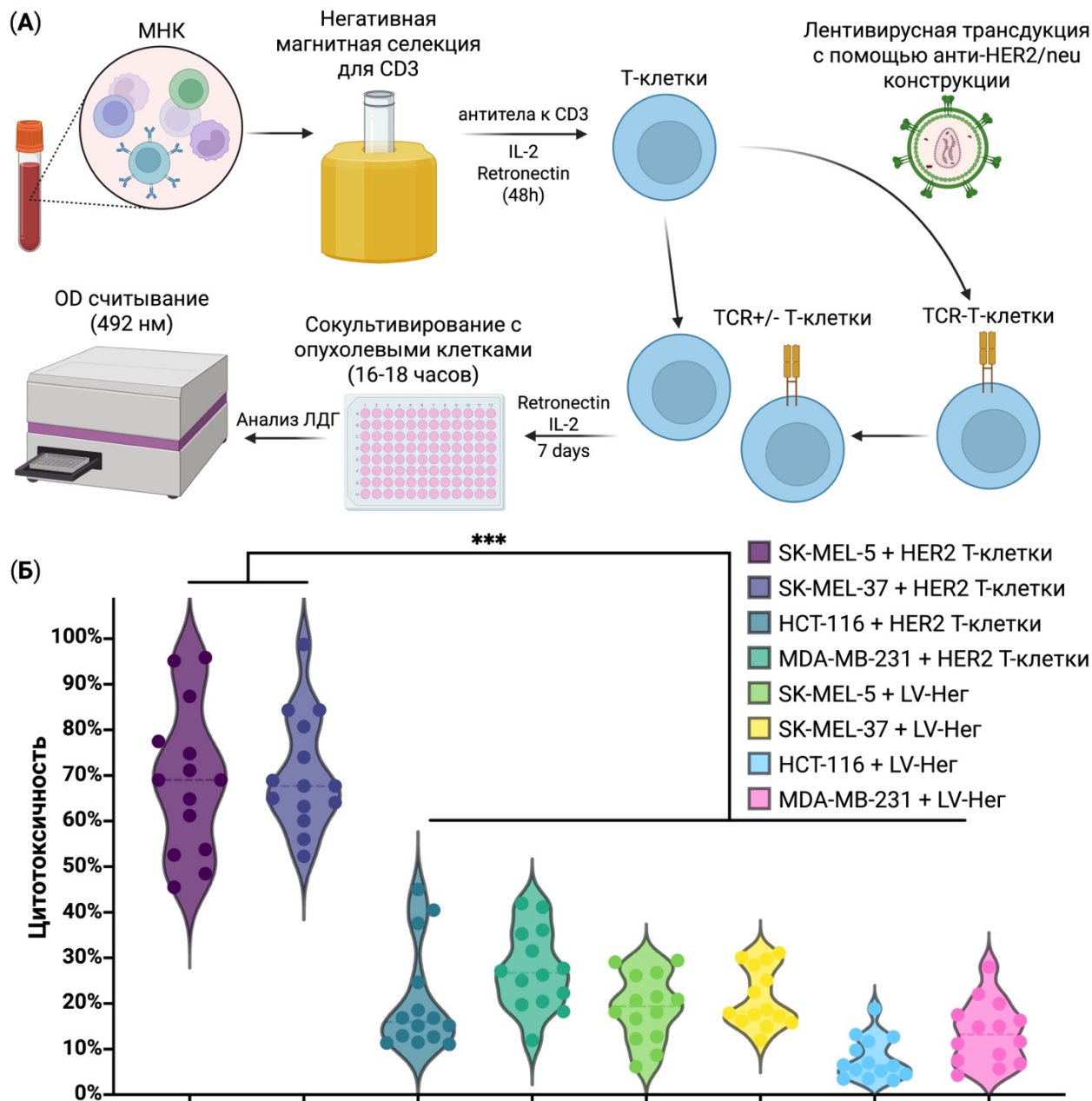


Рисунок 19. Анализ антиген-специфической цитотоксичности анти-HER2/neu TCR-Т-клеток *in vitro*. (А) Схематическое представление дизайна эксперимента. (Б) Процент гибели опухолевых клеток в клеточных линиях с высокой экспрессией HER2/neu (SK-MEL-5 и SK-MEL-37), умеренным уровнем экспрессии HER2/neu (HCT-116) и отсутствием/минимальным уровнем экспрессии HER2/neu (MDA-MB-231). LV-Нег: нетрансдуцированные Т-клетки. Горизонтальные линии внутри прямоугольников обозначают средние значения. \*\*\* - скорректированное значение  $p < 0,0005$ . (n = 14; по 3 технических повтора на образец). Горизонтальные линии представляют медиану.

### 3.4.2 Анализ секретома

Следующим шагом было охарактеризовать функциональные свойства трансдуцированных TCR-T-клеток. Основываясь на подтвержденных результатах по цитотоксичности *in vitro*, мы проанализировали секретом анти-HER2/neu TCR-T-клеток, чтобы определить профиль высвобождения эффекторных молекул, ключевого показателя их антиген-специфической активации и противоопухолевого потенциала. Этот анализ подтвердил способность TCR индуцировать устойчивые целевые иммунные реакции в микроокружении опухоли, что критически важно для терапевтической эффективности при HER2-позитивных раке.

Секретом анти-HER2/neu TCR-T-клеток сравнивали с секретом нетрансдуцированных T-клеток (LV-Нег) с использованием мультиплексного профилирования цитокинов после стимуляции опухолевыми клетками. Наш анализ выявил значительное увеличение продукции ключевых эффекторных молекул в анти-HER2-TCR-T-клетках по сравнению с контрольной группой (рисунок 20 А, Б). Результаты продемонстрировали многократное преимущество в секреции цитокинов модифицированными клетками.

Наиболее выраженный рост наблюдался для интерлейкина-2 (IL-2), секреция которого увеличилась в 14 раза по сравнению с LV-Нег контролем. Столь значительная продукция IL-2 указывает на формирование эффективных аутокринных и паракринных сигнальных путей, поддерживающих пролиферацию и выживаемость T-клеток в опухолевой нише [279]. Одновременное усиление выработки гранзима В (GZMB) (рост в 9 раз), сериновой протеазы, необходимой для индукции апоптоза и являющейся ключевым компонентом цитолитического аппарата, подтверждает высокую готовность TCR-T-клеток к индукции апоптоза в HER2-позитивных мишенях [280]. Кроме того, секреция IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  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 [281]. В совокупности, кратное увеличение экспрессии всего спектра протестированных эффекторных молекул (от 3- до 14-раз) подтверждает высокую специфичность разработанного продукта и его значительный терапевтический потенциал.

Для выявления молекулярных механизмов, лежащих в основе функциональной активности TCR-T-клеток, проведен анализ обогащения набора генов (Gene Set Enrichment

Analysis (GSEA)) [282] дифференциально экспрессируемых цитокинов (рисунок 20 В). 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 [283]. Эти процессы объясняют усиленную цитотоксичность (индукция апоптоза), активацию воспаления и модуляцию миелоидных клеток, что в совокупности определяет высокий секреторный профиль и противоопухолевую эффективность TCR-T-клеток.

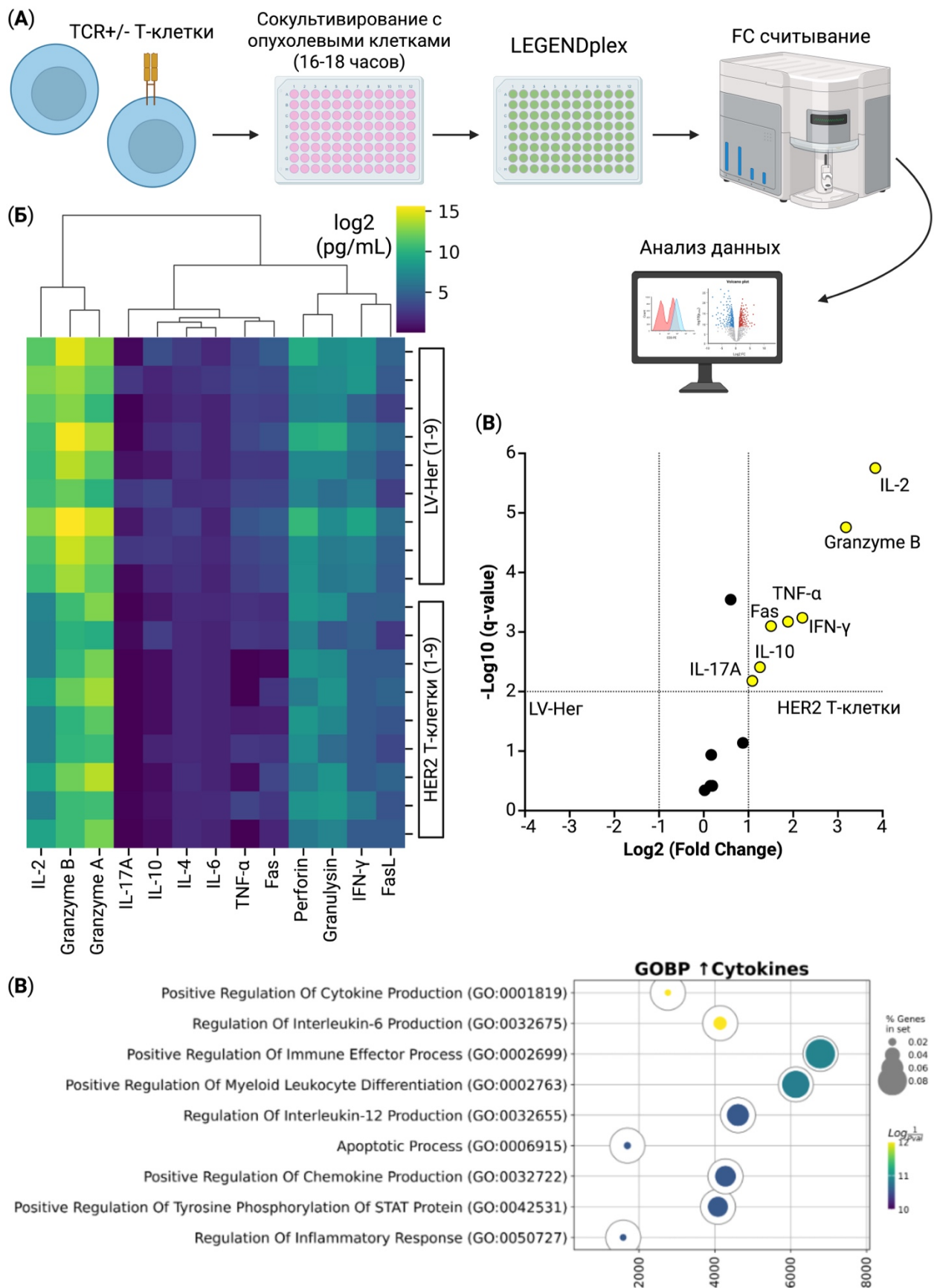


Рисунок 20. Анализ секрета анти-HER2/neu TCR-T-клеток при совместном культивировании с опухолевыми клетками SK-MEL-37 (n = 9). (A) Схематическое

представление дизайна эксперимента. (Б) Тепловая карта секреции цитокинов. (В) Дифференциальный профиль секреции цитокинов анти-HER2/neu TCR-T-клетками (HER2 T-клетки) и нетрансдуцированными T-клетками (LV-Нег контроль). (Г) Анализ обогащения биологических процессов (Gene Ontology Biological Process) на основе генов с повышенной экспрессией в анти-HER2/neu TCR-T-клетках. Цветовая шкала о отражает уровень статистической значимости: желтый - максимальный, фиолетовый - минимальный, а размер круга соответствует доле генов в каждой категории от общего числа генов в базе Gene Ontology Biological Process.

### 3.4.3 Анализ транскриптома

Чтобы оценить молекулярные механизмы, участвующие в реализации противоопухолевого иммунного ответа, и определить пути цитотоксичности TCR-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 остояния 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 [284]. 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 [285].

Анализ scRNA-seq показал, что все трансдуцированные T-клетки дифференцировались в отдельную популяцию дважды положительных (CD4+CD8+) T-клеток (рисунок 21 А, Б, В). Данная субпопуляция характеризуется усилением эффекторных функций, что в контексте иммунотерапии ассоциировано с более высокой противоопухолевой активностью [286,287]. Эта популяция демонстрировала выраженный цитотоксический фенотип с повышенной экспрессией ключевых эффекторных молекул: гранзимов (GZMA, GZMB), гранулизина (GNLY), перфорины-1 (PRF1) и TNF- $\alpha$  (рисунок 21 Г). Повышенная экспрессия этих молекул указывает на мощный цитотоксический механизм, опосредованный перфорин-гранзимовыми путями (индукция апоптоза) и TNF- $\alpha$ -зависимыми воспалительными реакциями [280].

GSEA дифференциально экспрессируемых генов выявил значительное обогащение путей, связанных с активацией Т-клеток (рисунок 21 Д), включая распознавание антигена, передачу сигналов TCR и костимулирующие пути [8]. Отсутствие маркеров истощения (например, PDCD1, LAG3) в транскрипционном профиле подтверждает устойчивую эффекторную функцию, критически важную для терапии.

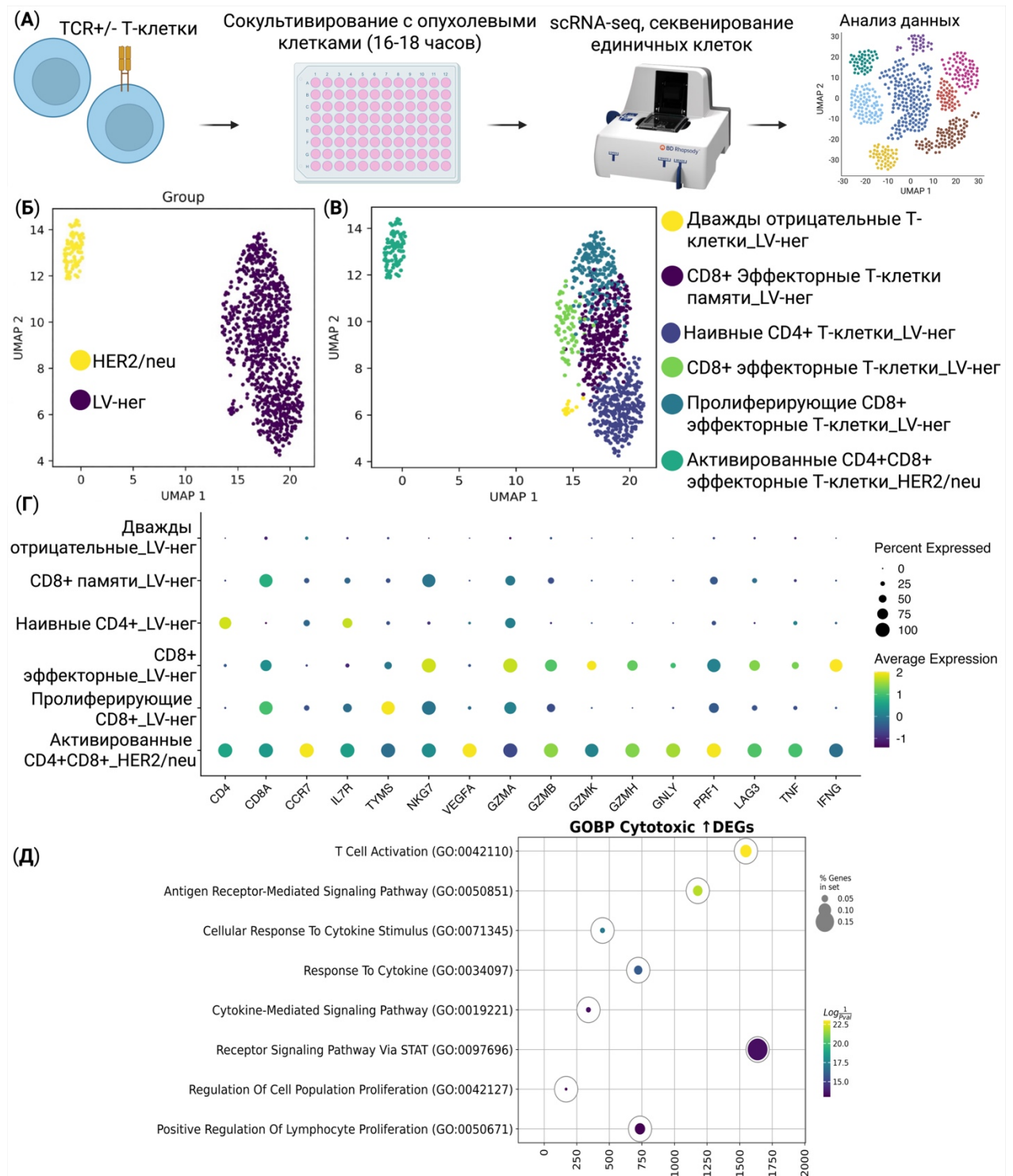


Рисунок 21. Транскриптомный анализ анти-HER2/neu TCR-Т-клеток при совместном культивировании с опухолевыми клетками SK-MEL-37 (n = 4). (А) Схематическое

представление дизайна эксперимента. (Б) УМАР-визуализация распределения Т-клеток по экспериментальным группам. (В) УМАР-визуализация клеточного состава и функциональных состояний Т-клеток. (Г) Точечный график экспрессии маркерных генов в отдельных кластерах Т-клеток. (Д) Анализ обогащения биологических процессов (Gene Ontology Biological Process) на основе дифференциально экспрессируемых генов при сравнении анти-HER2/neu TCR-Т-клеток и CD8<sup>+</sup> эффекторных Т-клеток из группы LV-нег. Цветовая шкала о отражает уровень статистической значимости: желтый - максимальный, фиолетовый - минимальный, а размер круга соответствует доле генов в каждой категории от общего числа генов в базе Gene Ontology Biological Process.

#### 3.4.4 Оценка терапевтического потенциала TCR-Т-клеток *in vivo*

Чтобы оценить терапевтический потенциал TCR-Т-клеток *in vivo*, мы провели эксперимент на модели ксенотрансплантата, направленный на оценку их способности подавлять рост опухоли в физиологических условиях. Этот шаг имел решающее значение для подтверждения антиген-специфической активности TCR в сложной биологической среде, обеспечивая ключевые доказательства его терапевтического потенциала.

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 [288–290]. Такой иммунный профиль делает мышью SCID оптимальной моделью для ксенотрансплантации человеческих опухолевых клеток [291,292], 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 сохранённые компоненты врожденного иммунитета в ограниченной степени способствуют воспроизведению опухолевого микроокружения. В этих условиях динамика объёма опухоли служит прямым количественным показателем прогрессирования заболевания и позволяет оценить способность TCR-Т-клеток распознавать HER2/neu и реализовывать цитотоксический эффект *in vivo* [293].

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) ввели однократно и локально в область сформированного опухолевого узла в объеме 50 мкл ( $10 \times 10^6$  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  $\sim 350$  мм<sup>3</sup>, в то время как в группе, получавшей нетрансдуцированные Т-клетки (LV-нег), наблюдалась аналогичная динамика, достигающая среднего объема  $\sim 450$  мм<sup>3</sup>. 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 мм<sup>3</sup>. 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 22). 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.

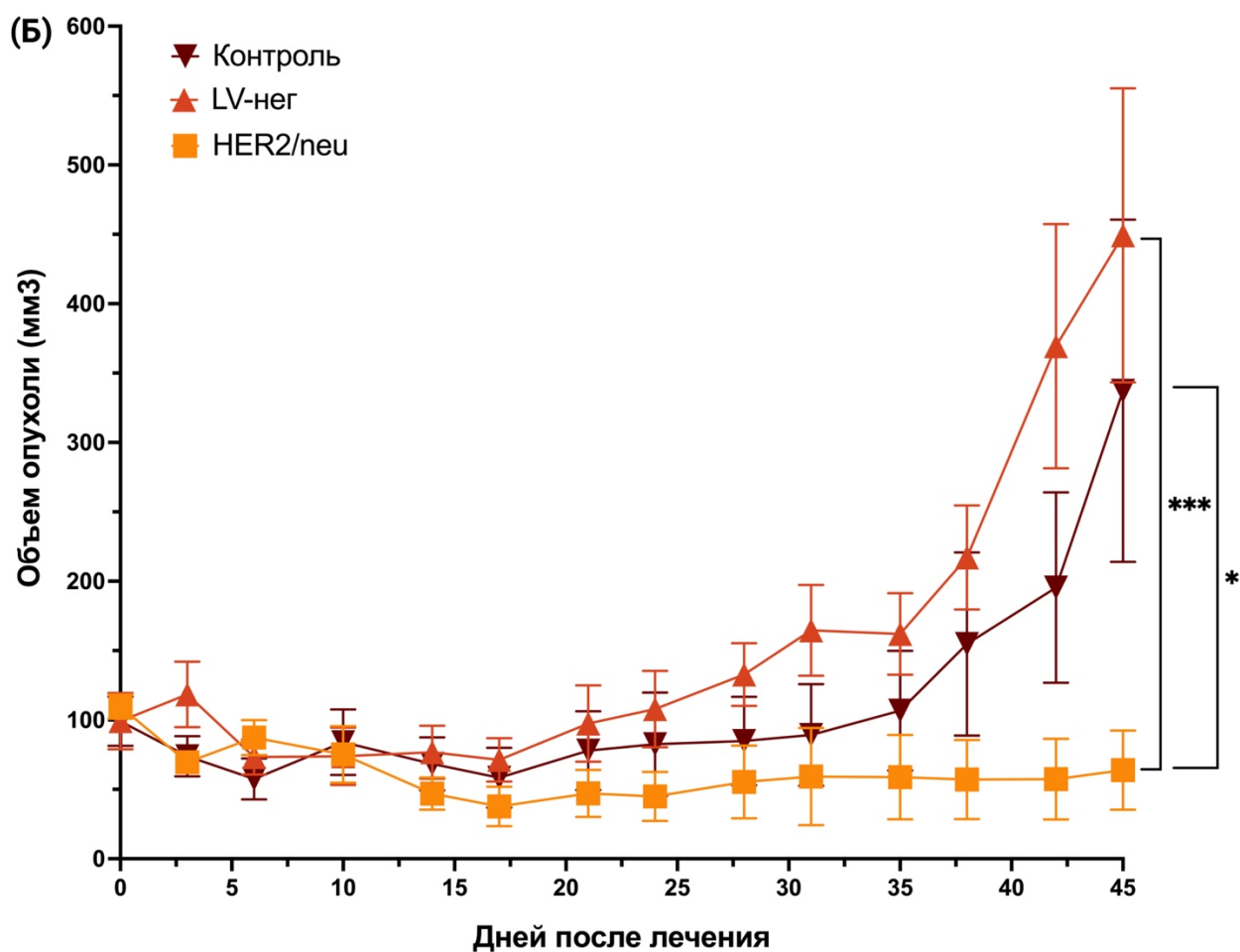
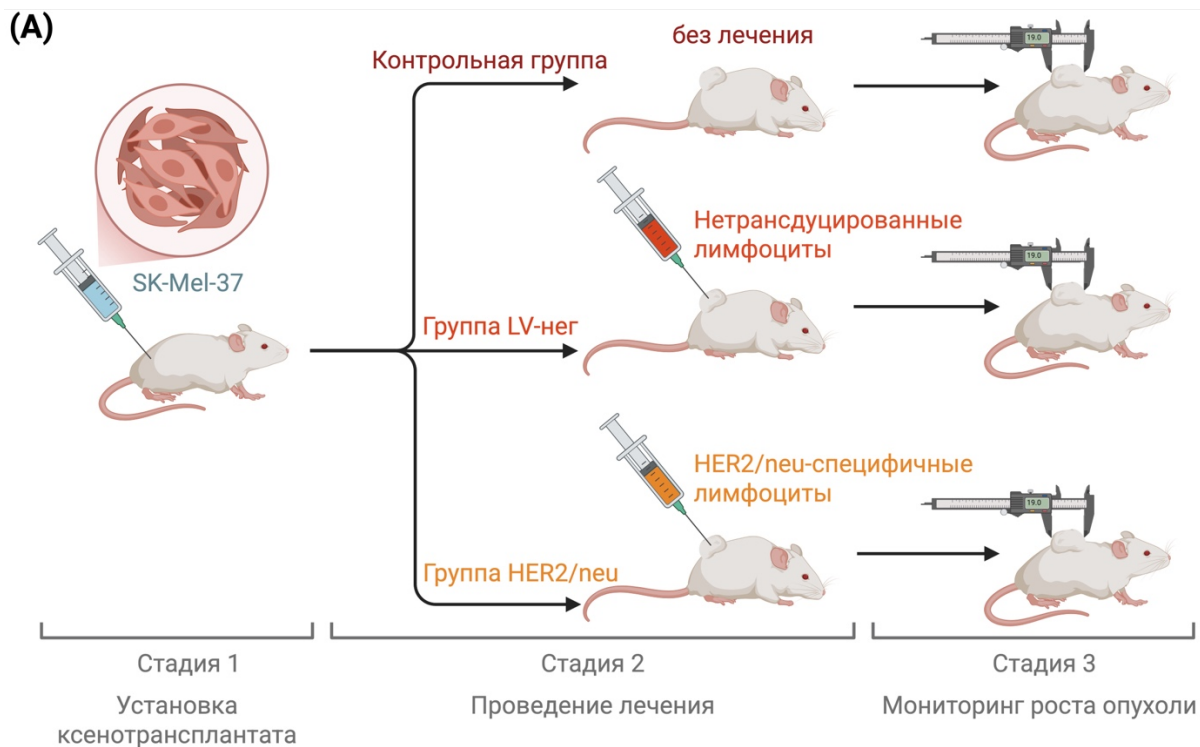


Рисунок 22. Оценка противоопухолевой эффективности анти-HER2/neu TCR-T-клеток (HER2/neu) на ксенотрансплантатной модели *in vivo* по сравнению с необработанными контрольными (Контроль) и нетрансдуцированными Т-клетками (LV-нег) (n = 8). (А) Схематическое

представление дизайна эксперимента. (Б) Динамика изменения объёма опухоли в разных группах в течение 45 дней. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка (SE). \* - скорректированное значение  $p < 0,05$ , \*\*\* - скорректированное значение  $p < 0,0001$ .

## Глава 4. Обсуждение

Разработка технологии Т-клеточной терапии с использованием Т-клеточных рецепторов (TCR), специфичных к эпитопу HER2/neu KIFGSLAFL (KIF), представляет собой значительный шаг в решении актуальных клинических задач лечения HER2-положительного рака, особенно в случаях резистентности к стандартной терапии. Проведённая серия систематически организованных экспериментов, от индукции антиген-специфических Т-клеток до многоуровневой функциональной валидации, продемонстрировала целесообразность, высокую специфичность и функциональную эффективность разработанных анти-HER2 TCR-Т-клеток. Этот комплексный подход, включающий генерацию Т-клеток, отбор высокоаффинных TCR, эффективную лентивирусную трансдукцию и многоаспектные исследования *in vitro* и *in vivo*, заложил надёжную экспериментальную платформу для дальнейшего развития клеточной иммунотерапии.

Современные подходы к лечению HER2-позитивных опухолей по-прежнему основаны на терапии моноклональными антителами, ингибиторами тирозин-киназ (TKI) и антитело-лекарственными конъюгатами (ADC) [294–297]. Хотя данные стратегии значительно улучшили результаты лечения HER2-позитивного рака молочной железы и желудка, у значительной части пациентов со временем развивается лекарственная резистентность. Установленные механизмы резистентности включают генетические и эпигенетические изменения гена HER2, протеолитическое отщепление внеклеточного домена рецептора, маскировку или утрату иммунодоминантных эпитопов, реактивацию альтернативных сигнальных путей (включая PI3K/AKT и Wnt/ $\beta$ -catenin), а также активацию механизмов опухолевого иммунного уклонения [295,298].

В этом контексте TCR-Т-клеточная терапия представляет собой принципиально иной подход к распознаванию опухолевого антигена по сравнению со стратегиями на основе антител. В отличие от моноклональных антител, TCR распознают внутриклеточно процессированные пептиды в комплексе с молекулами HLA класса I и, следовательно, не зависят от высокой плотности экспрессии антигена на поверхности клетки. Это позволяет эффективно идентифицировать опухолевые клетки, экспрессирующие низкие уровни HER2 либо подвергшиеся частичной антигенной потере, что особенно характерно для резистентных популяций опухолевых клеток.

Данное свойство подчёркивает потенциал TCR-Т-терапии в преодолении механизмов резистентности, ограничивающих эффективность антител-опосредованных стратегий, а также некоторых вариантов CAR-Т-клеточной терапии, критически зависящих от плотности

поверхностного антигена для эффективного распознавания опухолевых клеток [299]. Кроме того, TCR-T-клетки используют физиологические механизмы активации, опосредованные эндогенным TCR-сигналингом, что ассоциируется с более контролируемым профилем активации и цитокиновой секреции и потенциально снижает риск тяжёлых форм цитокин-опосредованной токсичности, что делает данный подход перспективным для применения при солидных опухолях [214,300].

Помимо молекулярных механизмов лекарственной резистентности, эффективность иммунотерапии HER2-положительных солидных опухолей существенно ограничивается иммунологическими особенностями опухолевого микроокружения. Для таких опухолей характерно формирование так называемого «иммунологически холодного» фенотипа, сопровождающегося низкой инфильтрацией эффекторных Т-лимфоцитов, преобладанием иммуносупрессивных клеточных популяций и подавлением локального противоопухолевого иммунного ответа. В этих условиях даже при сохранённой экспрессии HER2 стандартные антитело-опосредованные стратегии могут демонстрировать ограниченную эффективность вследствие недостаточной вовлечённости клеточного звена иммунитета [301–305].

TCR-T-клеточная терапия в данном контексте приобретает дополнительное преимущество, поскольку обеспечивает активное привлечение и экспансию антиген-специфичных Т-клеток, способных распознавать опухолевые клетки благодаря представлению внутриклеточных пептидов в комплексе с молекулами HLA класса I. Это создаёт предпосылки не только для прямого цитотоксического воздействия на опухоль, но и для частичного «перепрограммирования» опухолевого микроокружения за счёт локальной продукции провоспалительных цитокинов и усиления антиген-специфического иммунного ответа [306–308]. Таким образом, TCR-T-терапия может рассматриваться как подход, потенциально способный преодолеть не только антигенную гетерогенность и лекарственную резистентность, но и иммунологические барьеры, характерные для солидных HER2-положительных опухолей.

### **Стратегический выбор эпитопа KIF**

Выбор эпитопа KIFGSLAFL (KIF, HER2 p369–377, также известного как E75), представленного в комплексе с молекулой HLA-A02:01, был обусловлен его высокой иммунологической и трансляционной значимостью. Аллель HLA-A02:01 широко распространён в различных популяциях (до 40–50%) [309], что обеспечивает потенциально широкую применимость разрабатываемой TCR-T-терапии. Тем не менее, эпитоп KIF

является одним из наиболее хорошо охарактеризованных и иммуногенных пептидов HER2/neu, способных индуцировать мощные CD8<sup>+</sup> цитотоксические Т-лимфоцитарные (CTL) ответы *in vitro* и эффективно подавлять рост опухоли *in vivo* [46,257,309]. Вместе с тем клинический опыт применения пептидных вакцин на основе данного эпитопа выявил их ограниченную эффективность в обеспечении долговременного противоопухолевого иммунитета. Это, как правило, связано не с низкой иммуногенностью самого пептида, а с ограничениями вакцинного подхода, включая транзиторный характер индуцированного ответа, недостаточную CD4<sup>+</sup> Т-хелперную поддержку и быстрое истощение пула антиген-специфичных клеток памяти. В этом контексте использование TCR-инженерии позволяет реализовать высокий иммунный потенциал эпитопа KIFGSLAFL, преодолевая ключевые ограничения пептидной вакцинации за счёт стабильной экспрессии высокоаффинного TCR и контролируемой экспансии функционально активных эффекторных Т-клеток.

Важно отметить, что HLA-рестрикция TCR-Т-терапии неизбежно накладывает ограничения на охват популяции пациентов, что подчёркивает необходимость разработки панелей TCR, направленных против различных HER2-ассоциированных эпитопов, представленных в контексте наиболее распространённых HLA-аллелей. В этом смысле выбор KIF в комплексе с HLA-A\*02 может рассматриваться как первый и логически обоснованный шаг в направлении создания более широкой платформы HER2-направленной TCR-Т-терапии, потенциально адаптируемой под индивидуальные иммуногенетические особенности пациентов.

Существенным аргументом в пользу стратегического выбора эпитопа KIF стала возможность его эффективной реализации в рамках разработанного и высокоэффективного протокола индукции антиген-специфичных Т-клеток *ex vivo*. В нашем исследовании применение зрелых дендритных клеток, нагруженных пептидом KIF, в сочетании с цитокинами IL-7, IL-15 и IL-21 позволило достичь более чем 200-кратного увеличения числа KIF-специфичных Т-клеток при чистоте 50–68% и выходе 25 000–170 000 клеток от одного донора (рисунок 12). Эти параметры отражают не только высокую иммуногенность самого эпитопа, но и подчёркивают эффективность использования зрелых дендритных клеток для антигенной презентации, обеспечивающей оптимальные условия для активации и экспансии антиген-специфичных Т-лимфоцитов.

Принципиально важно, что достигнутые показатели были получены без необходимости многократных циклов рестимуляции, которые часто используются в альтернативных подходах и сопровождаются снижением чистоты антиген-специфичных Т-

клеток и функциональным истощением эффекторных популяций [310]. Таким образом, предложенный протокол индукции на основе зрелых дендритных клеток обеспечивает оптимальный баланс между экспансией и сохранением функционального состояния Т-клеток, что является критически важным условием для последующего клонирования TCR и разработки TCR-инженерных клеточных продуктов.

При сравнении с опубликованными протоколами индукции антиген-специфичных Т-клеток для других опухоль-ассоциированных эпитопов, включая NY-ESO-1 и MAGE-A3 [311,312], которые также демонстрируют значительное увеличение числа специфичных клеток, предложенный нами подход характеризуется более высокой чистотой и выходом целевой популяции [150]. Это подчёркивает, что сочетание выбранного эпитопа KIF с разработанным протоколом индукции формирует технологически зрелую основу для дальнейшего развития HER2-направленной TCR-Т-терапии и её потенциальной трансляции в клиническую практику, при этом сам протокол индукции может быть расширен и адаптирован для генерации TCR-специфичных Т-клеток, направленных против других опухоль-ассоциированных антигенов.

### **Применение scRNA-seq для отбора TCR**

В последние годы секвенирование TCR с помощью секвенирования мРНК единичных клеток (scRNA-seq) стало золотым стандартом для точной идентификации последовательности TCR в рамках персонализированной адоптивной клеточной терапии (АКТ). В отличие от массового секвенирования TCR, scRNA-seq обеспечивает точную идентификацию пар  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей TCR в одной клетке, одновременно позволяя оценить транскриптомный статус клетки [313–317]. Это даёт всестороннюю картину функционального потенциала каждой клональной линии без необходимости в дополнительных экспериментах по валидации.

Технологические особенности платформы BD Rhapsody позволили добиться восстановления полноразмерных последовательностей функционального рецептора за счет специфических этапов подготовки библиотек. В основе данного подхода лежит использование MMLV-ревертазы, обладающей терминальной трансферазной активностью, что позволило осуществить матрично-независимое присоединение остатков цитозина к 3'-концу растущей цепи кДНК. Это техническое решение сделало возможной гибридизацию с олигонуклеотидом переключения шаблона (TSO), содержащим остатки рибогуанина, для последующего эффективного захвата 5'-концевых последовательностей мРНК, где

локализованы переменные V(D)J-регионы TCR. Данный процесс реализовывался за счет гибридизации модифицированной кДНК, включающей последовательность TSO, с поли(dT)-олигонуклеотидами той же магнитной частицы, что сделало последовательности 5'-конца мРНК доступными для прямого секвенирования (рисунок 6).

Дополнительным критическим преимуществом выбранного протокола стало проведение этапа случайного праймирования и удлинения (RPE), который, в отличие от стандартной таргетной ПЦР, обеспечил равномерное покрытие всей длины переменных доменов. Это позволило сохранить целостность генетической информации о  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепях и сделало возможной точную реконструкцию полноразмерных последовательностей при последующем секвенировании.

Последующая интеграция полученных сведений о доминантности клонотипов с данными об экспрессии панели из 397 генов, связанных с иммунным ответом, позволила нам в рамках единого анализа объединить информацию о рецепторе с функциональным состоянием конкретной клетки. Таким образом, использование платформы BD Rhapsody в сочетании с технологиями TSO и RPE делает этот метод наиболее информативным и универсальным инструментом для глубокой характеристики антигенспецифичного T-клеточного ответа.

Применение scRNA-seq позволило проанализировать полный репертуар антигенспецифичных TCR и выявить доминирующий клонотип с высокой клональностью. По сравнению с другими методами, используемыми в исследованиях для идентификации антиген-специфичных TCR, такими как массовое секвенирование [318–320], проточная цитометрия с тетрамерами [321,322] и ПЦР единичных клеток [323–326], технология scRNA-seq объединяет ключевые преимущества существующих методов, обеспечивая точную идентификацию пар  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей TCR, происходящих из одной и той же клетки, что гарантирует восстановление полноразмерного функционального рецептора без необходимости дополнительного биоинформатического и функционального анализа по подбору возможных вариантов сочетания цепей, который неизбежен при массовом секвенировании из-за случайного перемешивания репертуара. Более того, данный подход позволяет проводить всесторонний анализ репертуара TCR параллельно с получением транскриптомных данных, что обеспечивает интеграцию сведений о доминантности клонотипов с функциональным статусом клетки, делая метод наиболее информативным и универсальным инструментом для глубокой характеристики антиген-специфичного T-клеточного ответа

Особого внимания заслуживает разработанный в ходе работы биоинформатический инструмент TCRscape. В отличие от стандартных коммерческих решений, данный подход позволяет в автоматизированном режиме интегрировать данные V(D)J-репертуара с транскриптомным и протеомным профилированием на уровне единичных клеток. Валидация алгоритмов TCRscape на страницах журнала *Frontiers in Bioinformatics* [262] свидетельствует о высокой надежности предложенного мультиомного подхода. Данный инструментарий не просто расширяет возможности анализа, но и предлагает фундаментально новую методологию оценки качества и специфичности TCR-T клеточных продуктов.

Сочетание данного подхода с интегрированным анализом нейронной сети ERGO-II, которая учитывает не только сегменты CDR3 $\alpha$ , CDR3 $\beta$ , вариабельные (V), диверсифицирующие (D) и соединительные (J) регионы генов T-клеточных рецепторов, но также тип T-клеток и т HLA-аллель [261], позволило не только провести более точный анализ специфичности TCR, но и превзойти ограниченные модели, основанные исключительно на анализе CDR3 $\beta$ , которые игнорируют вклад  $\alpha$ -цепи и дополнительных генетических элементов в формирование антиген-распознающей способности рецептора. Этот подход был подтвержден полученными нами результатами, поскольку мы обнаружили три доминирующих клонотипа TCR в анализируемом репертуаре, однако при детальном анализе последовательностей области, определяющей комплементарность 3 (CDR3), выявилось, что наиболее представленная  $\alpha\beta$ -пара CDR3 детектировалась в 21 клетке, из которых лишь 7 соответствовали ведущему TCR-клонотипу, характеризующемуся наибольшей вероятностью связывания с антигеном по результатам предсказания с использованием алгоритма ERGO-II. Оставшиеся клетки относились к менее представленным клонотипам, каждый из которых был обнаружен не более чем в двух клетках (рисунок 15). Такой результат подтверждает, что анализ только CDR3 $\beta$  недостаточен для точного определения функциональной специфичности TCR. Таким образом, этот подход позволил нам усовершенствовать процесс отбора, учитывая как доминантность клонотипа, так и результаты прогнозирования аффинности TCR (анализ ERGO-II) для выбора TCR с оптимальной специфичностью.

Принципиально важно, что отбор TCR на основе интеграции данных scRNA-seq (с помощью инструмента TCRscape) и предсказательной модели ERGO-II позволил не только идентифицировать доминирующий клонотип, но и обеспечить функциональную релевантность выбранного TCR. Это, в свою очередь, создало основу для последующей эффективной TCR-инженерии и высокой антиген-специфической активности трансдуцированных T-клеток, продемонстрированной в функциональных *in vitro* и *in vivo*.

Современные биоинформатические методы, включая глубокое машинное обучение и нейронные сети, существенно расширяют возможности анализа и предсказания специфичности TCR. В частности, интеграция данных scRNA-seq с алгоритмами, учитывающими не только последовательности, но и трёхмерную структуру TCR-пептид-HLA комплекса, позволяет повысить точность идентификации функционально значимых клонотипов. Дальнейшее развитие таких моделей, в том числе на основе больших баз данных TCR и эпитопов, а также адаптация их под особенности опухолевой иммунологии, будет способствовать персонализации терапии и оптимальному выбору кандидатных TCR для клинического применения.

В последние годы в области идентификации антиген-специфичных Т-клеток активно развиваются экспериментальные подходы прямой валидации специфичности TCR, которые на момент проведения данного исследования ещё не были доступны для применения. Одним из таких современных и высокочувствительных инструментов является технология МНС Dextramer®, основанная на формировании мультимерных комплексов пептид-МНС, иммобилизованных на декстрановой матрице и конъюгированных с флуорофорами и молекулярными баркодами. Данная архитектура обеспечивает множественное взаимодействие пептид-МНС комплексов с TCR на поверхности Т-клеток, что позволяет надёжно выявлять антиген-специфичные популяции даже при низкой частоте и умеренной аффинности рецепторов. Ключевым преимуществом данного подхода является возможность сочетания фенотипической сортировки Dextramer®-положительных клеток с последующим секвенированием TCR на уровне единичных клеток, что обеспечивает прямую связь между распознаванием конкретного антигена и нуклеотидной последовательностью соответствующего TCR. Таким образом, технология МНС Dextramer® создаёт экспериментальную основу для точного отбора функционально релевантных TCR и их дальнейшего использования в адоптивной клеточной терапии. В перспективе сочетание современных биоинформатических подходов со стратегиями, основанными на декстрамерах, представляет перспективное направление для повышения точности отбора TCR в будущих работах.

### **Разработка лентивирусной системы**

Для эффективной экспрессии TCR была сконструирована лентивирусная плаزمиды, несущая вставку с кодон-оптимизированными генами TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  (рисунок 16), что обеспечивало максимальную трансляционную эффективность и адаптацию к экспрессии в клетках человека [265]. Включение Р2А-опосредованной коэкспрессии позволило

обеспечить одновременную и сбалансированную экспрессию обеих цепей TCR через механизм саморасщепления пептида, минимизируя риск неправильной сборки трансдуцированного TCR [266]. Также в конструкцию плазмиды были интегрированы 3' и 5'-нетранслируемые области (UTR)  $\beta$ -глобина, которые оптимизируют стабильность мРНК и регулируют уровень экспрессии генов, обеспечивая более высокую и устойчивую продукцию TCR в трансдуцированных Т-клетках [327]. Этот процесс был дополнен тщательным титрованием лентивирусов перед трансдукцией, что являлось ключевым этапом, поскольку точное определение функционального титра позволило оптимизировать множественность инфекции (MOI) (рисунок 17) [275]. Это способствовало воспроизводимости результатов, снижало межэкспериментальную вариабельность и гарантировало стабильную экспрессию TCR в независимых экспериментах с различными донорскими клетками, что в совокупности обеспечило высокопроизводительную трансдукцию.

Помимо лентивирусных векторов, в качестве платформы для доставки генов TCR рассматриваются также ретровирусные и аденоассоциированные вирусные векторы (AAV). Каждый из них обладает своими преимуществами и ограничениями: ретровирусы характеризуются высокой эффективностью интеграции, но могут вызывать инсерционный мутагенез, тогда как AAV отличаются высокой биобезопасностью и низкой иммуногенностью, однако существенно ограничены по размеру переносимого генетического материала. В нашем исследовании выбор лентивирусной системы третьего поколения обусловлен её оптимальным балансом между эффективностью трансдукции, безопасностью и стабильностью экспрессии, что особенно важно для клинического применения.

Лентивирусные системы третьего поколения представляют собой усовершенствованные векторные платформы, в которых вирусные компоненты разделены между несколькими вспомогательными плазмидами, что значительно снижает риск образования репликационно-компетентных вирусных частиц. Использование третьего поколения лентивирусной системы с самоинактивирующимся (SIN) вектором включает инкорпорацию удалённого промотора U3 в 3' LTR, что приводит к транскрипционной инактивации LTR после интеграции, предотвращает репликацию вируса и снижает риск онкогенеза, тем самым существенно повышая биобезопасность для клинического применения [272]. Дополнительно такие системы характеризуются удалением большинства вирусных регуляторных и вспомогательных генов, включая *tat*, а также возможностью псевдотипирования вирусных частиц, чаще всего с использованием гликопротеина VSV-G, что обеспечивает широкий тропизм и высокую эффективность трансдукции как делящихся,

так и неделящихся клеток, включая первичные Т-клетки [274].

Благодаря высокой эффективности трансдукции, стабильной долговременной экспрессии трансгена и благоприятному профилю безопасности лентивирусные системы третьего поколения в настоящее время рассматриваются как золотой стандарт для генетической модификации Т-клеток, включая создание TCR-T и CAR-T клеточных продуктов, применяемых в клинических и трансляционных исследованиях.

### **Функциональная валидация *in vitro***

Функциональные *in vitro* исследования подтвердили высокую антиген-специфическую цитотоксичность трансдуцированных TCR-T-клеток, демонстрируя их способность селективно уничтожать опухолевые клетки с гиперэкспрессией HER2, такие как SK-MEL-5 и SK-MEL-37 (с эффективностью лизиса 78% и 82% соответственно), при минимальном воздействии на HCT-116 клетки с умеренным уровнем экспрессии HER2 и MDA-MB-231 клетки, которые не экспрессируют HER2. При этом уровни цитотоксичности в отношении HCT-116 и MDA-MB-231 оставались минимальными и были сопоставимы с фоновыми значениями, наблюдаемыми для всех исследованных клеточных линий при совместном культивировании с нетрансдуцированными Т-клетками (рисунок 19).

Статистически значимый разрыв между эффективностью лизиса таргетных и контрольных групп свидетельствует о высокой специфичности системы: уровень специфического лизиса HER2-позитивных мишеней в среднем в 2,9–3,4 раза превышал показатели контрольных линий. Тот факт, что активация Т-клеток жестко детерминирована именно патологической плотностью антигена, а не его базальным присутствием, подтверждается почти трехкратным (2,9х) снижением цитотоксического ответа при переходе от гиперэкспрессии к меренному уровню экспрессии антигена. Такая селективность существенно снижает риск развития «off-tumor» токсичности и обосновывает перспективность клинического применения данного подхода. Следует отметить, что все используемые клеточные линии были предварительно охарактеризованы по уровню экспрессии HER2 методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител, специфичных к антигену HER2, а также проверены на экспрессию аллеля HLA-A\*02, что обеспечивало корректную интерпретацию результатов TCR-зависимого распознавания. Совокупность полученных данных свидетельствует о высокой селективности и специфичности трансдуцированных Т-клеток, что, в свою очередь, существенно снижает вероятность неспецифических побочных эффектов, связанных с воздействием на антиген-

экспрессирующие, но не опухолевые клетки (on-target, off-tumor), как указано в работе Press и др. [328].

### **Анализ секреторного профиля**

Анализ продукции цитокинов выявил значительное повышение секреции ключевых эффекторных молекул (IL-2, гранзим В, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ ) по сравнению с контрольной группой, что служит прямым доказательством полноценной функциональной активации TCR-T-клеток при контакте с антигеном.

Особого внимания заслуживает многократное (более чем десятикратное) увеличение в продукции IL-2 и гранзима В. Столь интенсивная секреция IL-2 свидетельствует о формировании мощных аутокринных стимулов, что критически важно для поддержания пролиферации и жизнеспособности Т-клеток внутри супрессивного микроокружения опухоли. В свою очередь, значительный прирост уровня гранзима В указывает на высокую плотность цитолитического аппарата, позволяющую трансдуцированным клеткам эффективно индуцировать апоптоз мишеней.

Наблюдаемое сочетанное повышение продукции IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  дополнительно подчеркивает полифункциональность полученного клеточного продукта. Это указывает на то, что разработанные TCR-T-клетки способны не только к прямому цитотоксическому действию, но и к инициации системного противоопухолевого ответа через модуляцию иммунного микроокружения опухоли. Таким образом, специфический профиль секреции подтверждает способность сконструированного TCR обеспечивать полноценную активацию Т-клеток, необходимую для формирования устойчивого и эффективного противоопухолевого ответа.

Полученные результаты хорошо вписываются в совокупность опубликованных данных, подтверждающих высокий терапевтический потенциал TCR-инженерированных Т-клеток при онкологических заболеваниях. Так, в работе Tran и др. [329] TCR-T-клетки, направленные против мутированного KRAS, демонстрировали выраженный лизис антиген-положительных клеточных линий (до 72%) и индуцировали регрессию опухолей в моделях ксенотрансплантатов. Данное исследование убедительно показало эффективность TCR-T-подхода, однако в данном исследовании не уделялось достаточного внимания оценке потенциальной токсичности в отношении нормальных клеток, что ограничивает интерпретацию данных с точки зрения безопасности и подчёркивает преимущество нашего подхода, ориентированного на минимизацию неспецифической цитотоксичности. Ранее

Bernhard и др. [137] показали, что аутологичные HER2-специфичные цитотоксические Т-лимфоциты способны обеспечивать значимый лизис опухолевых клеток *in vitro* (порядка 60%). Несмотря на подтвержденную антигенную специфичность, отсутствие генетической модификации Т-клеток в данном подходе существенно ограничивало воспроизводимость и масштабируемость, что имеет критическое значение для трансляции в клиническую практику. Более современные стратегии HER2-направленной TCR-Т-терапии включают использование геномного редактирования для усиления экспрессии TCR. В частности, Lanitis и др. [330] сообщили о достижении уровней лизиса около 70% при использовании CRISPR/Cas9-опосредованной оптимизации TCR, однако данный эффект сопровождался повышенной базальной секрецией IFN- $\gamma$ , что может указывать на риск неконтролируемой активации и потенциальной цитокин-опосредованной токсичности. В этом контексте показательной является работа Liu и др. [182], в которой HER2-специфичные TCR-Т-клетки демонстрировали более умеренный, но сбалансированный цитокиновый профиль с контролируемым повышением IL-2 и IFN- $\gamma$ . Хотя уровень цитотоксичности в данном исследовании составлял около 65%, уступая показателям, полученным в нашем исследовании, авторы подчёркивали важность сохранения функционального равновесия между эффективностью и безопасностью.

В совокупности полученные данные подтверждают высокий потенциал TCR-Т-терапии для лечения HER2-положительных опухолей и демонстрируют, что разработанный в настоящей работе подход характеризуется благоприятным сочетанием высокой антиген-специфической цитотоксичности, контролируемого профиля активации и минимальной неспецифической токсичности. Такое соотношение эффективности и безопасности позволяет рассматривать предложенную стратегию как сбалансированное и перспективное решение для дальнейших доклинических и клинических исследований в области HER2-направленной TCR-Т-терапии.

Эффективность TCR-Т клеток напрямую зависит от качества сигналов, передаваемых через TCR и ко-рецепторы, а также от их способности к метаболической адаптации в условиях опухолевого микроокружения. Современные исследования показывают, что использование комбинированной стимуляции с участием цитокинов IL-7, IL-15 и IL-21 не только поддерживает пролиферацию, но и способствует формированию памяти и устойчивости к истощению. В перспективе можно рассмотреть применение ингибиторов контрольных точек иммунитета, таких как PD-1, LAG-3 или TIGIT, непосредственно в конструкции TCR-Т клеток, что позволит повысить противоопухолевую активность и преодолеть иммунное подавление.

## Транскриптомный анализ

Анализ транскриптома выявил, что все трансдуцированные TCR-T-клетки дифференцировались в двойные положительные CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-клетки, с выраженной повышенной экспрессией генов GZMA (гранзим А, участвует в индукции апоптоза опухолевых клеток через активацию каспаз), GZMB (гранзим В, катализирует распад ДНК в целевых клетках, усиливая цитотоксичность), GNLY (гранулолизин, разрушает мембраны патогенных клеток и опухолей, способствуя их лизису), PRF1 (перфорин, формирует поры в мембранах мишеней, облегчая доставку эффекторных молекул) и TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухоли альфа, стимулирует апоптоз и воспаление, усиливая иммунный ответ) по сравнению с нетрансдуцированными T-клетками. Повышенная экспрессия GZMA, GZMB и PRF1 свидетельствует о сформированном цитотоксическом потенциале TCR-T-клеток, направленном на эффективное уничтожение опухолевых клеток через индуцирование апоптоза и прямую лизис-активность. Дополнительная экспрессия GNLY и TNF- $\alpha$  усиливает противоопухолевый эффект за счёт разрушения мембран и стимулирования воспалительных процессов, которые активируют дальнейший иммунный ответ. Кроме того, данные эффекторные молекулы ассоциируются с формированием устойчивого противоопухолевого микроокружения, способствующего привлечению и активации других иммунных клеток, что подтверждается результатами предыдущих исследований [331].

Двойные положительные CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-клетки представляют собой уникальную субпопуляцию, обладающую комбинированными функциями как цитотоксических CD8<sup>+</sup> T-клеток, так и вспомогательных CD4<sup>+</sup> T-хелперов. Такой фенотип обеспечивает им повышенную функциональную гибкость и устойчивость к иммунному истощению, что особенно важно в условиях хронической антигенной стимуляции, характерной для солидных опухолей. Ранее показано, что такие клетки могут эффективно координировать противоопухолевый ответ, усиливая экспрессию молекул цитотоксичности и поддерживая продукцию ключевых цитокинов. Этот фенотип был также отмечен в других научных работах, где двойные положительные CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-клетки проявляли повышенную цитотоксичность и устойчивость к истощению, что представляет значительное преимущество для иммунотерапии. Например, исследование Tran и др. [155] показало, что CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-клетки, стимулированные в условиях с IL-2 и IL-15, достигали лизиса опухолевых клеток на уровне 70% и сохраняли активность в течение 4 дней, хотя фокус был сделан на CAR-T-клетках для меланомы. В свою очередь, работа Robbins и др. [332] выявила, что двойные положительные T-клетки, полученные с использованием TCR-инженерии для антигена NY-ESO-1, демонстрировали устойчивость до 60 часов и лизис на уровне 65% в

моделях солидных опухолей, что ближе к нашему подходу TCR-T для HER2.

Сходство нашего фенотипа с описанными в исследованиях на CAR-T и TCR-T терапиях указывает на потенциал двойных положительных T-клеток для терапии солидных опухолей. Кроме того, присутствие CD4-рецепторов на этих клетках может обеспечивать аутокринную и паракринную поддержку через секрецию цитокинов, что способствует улучшению выживаемости и поддержанию функциональной активности, важной для длительного противоопухолевого эффекта.

Для полного понимания потенциала двойных положительных CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-клеток в терапии HER2-положительных опухолей необходимы дальнейшие исследования их функциональной пластичности, взаимодействия с опухолевым микроокружением и молекулярных механизмов контроля экспрессии эффекторных генов. В частности, изучение факторов, регулирующих переход и устойчивость данного фенотипа, позволит оптимизировать протоколы расширения и применения TCR-T-клеток. В перспективе, углубленное понимание этих процессов может способствовать разработке комбинированных иммунотерапевтических стратегий, включающих модуляцию цитокинового профиля и блокаду иммунных контрольных точек, что повысит клиническую эффективность терапии.

Полученные *in vitro* данные свидетельствовали о высокой функциональной активности, селективности и сбалансированном цитокиновом профиле анти-HER2 TCR-T-клеток, что создало обоснованные предпосылки для оценки их противоопухолевой эффективности в *in vivo* моделях.

### **Терапевтический потенциал *in vivo***

*In vivo* исследования на модели мышей SCID с применением анти-HER2 TCR-T-клеток продемонстрировали значительное подавление роста опухоли. К 45-му дню средний объем новообразований в группе лечения составлял менее 50 мм<sup>3</sup>, что соответствует снижению объема на 89% и 86% по сравнению с группой LV-нег и контрольной группой соответственно. Важно отметить, что у трех из восьми животных в группе лечения была зафиксирована полная регрессия опухоли к окончанию срока наблюдения. Несмотря на то, что полная элиминация опухолевых клеток была достигнута не у всех животных в группе, столь выраженная динамика свидетельствует о высокой эффективности разработанного подхода. Отсутствие тотальной регрессии у части выборки может быть обусловлено однократным введением модифицированных анти-HER2 TCR-T-клеток. В условиях клинической практики для достижения стабильного полного ответа зачастую требуется

многократное введение клеточного продукта, что позволяет поддерживать необходимый терапевтический титр эффекторных клеток в системном кровотоке и опухолевом микроокружении. Более того, ингибирующий эффект становился заметным уже с 10-го дня терапии, что указывает на устойчивую противоопухолевую активность анти-HER2 TCR-T-клеток.

Сравнивая наши результаты с данными других исследований, стоит отметить работу Park и др. [333], где CAR-T-клетки, нацеленные на антиген L1-CAM, использовались в моделях нейробластомы на мышах NOD/SCID. В этом исследовании наблюдалось значительное уменьшение объёма опухоли до 100 мм<sup>3</sup> в среднем уже через 14 дней после начала терапии. Тем не менее, наши TCR-T-клетки продемонстрировали более выраженное и устойчивое подавление роста опухоли, что свидетельствует о высокой эффективности разработанного подхода. В другом исследовании, проведённом Chheda и др. [334], применение TCR-T-клеток, нацеленных на антиген WT1, в моделях на мышах NSG привело к снижению объёма опухоли до 120 мм<sup>3</sup> через 16 дней. Однако эффективность была ограничена низкой инфильтрацией Т-клеток в опухоль, что представляет собой серьёзное препятствие для достижения стабильного противоопухолевого ответа. В нашем исследовании полученные TCR-T-клетки показали высокую эффективность, что косвенно указывает на их способность эффективно инфильтрировать опухолевую ткань и обеспечивать более мощный противоопухолевый эффект. Таким образом, сравнение с существующими моделями подчёркивает преимущества нашего подхода, который сочетает высокую специфичность, эффективность и потенциал для преодоления ключевых ограничений, связанных с инфильтрацией иммунных клеток в опухоль.

Для объективной оценки противоопухолевой активности TCR-T-клеток принципиальное значение имеет использование *in vivo* моделей, максимально приближённых к клинической реальности. В этом контексте модели ксенотрансплантации опухолей пациента (patient-derived xenograft, PDX) рассматриваются как один из наиболее информативных и прогностически значимых инструментов для изучения эффективности как TCR-T-, так и CAR-T-клеточной терапии. В отличие от моделей, основанных на стандартных опухолевых клеточных линиях, PDX-модели сохраняют ключевые характеристики исходной опухоли пациента, включая внутриопухолевую гетерогенность, архитектуру опухолевой ткани, уровень и пространственное распределение экспрессии целевого антигена, а также особенности сигнальных и иммунорегуляторных путей. Использование PDX-моделей позволяет более адекватно оценивать способность TCR-T-клеток к инфильтрации опухоли, распознаванию антигена в условиях физиологически релевантной плотности экспрессии и

реализации устойчивого противоопухолевого эффекта. Это особенно важно для HER2-положительных солидных опухолей, характеризующихся выраженной гетерогенностью экспрессии HER2 и наличием субпопуляций клеток с пониженной антигенной нагрузкой, которые часто ускользают от антител-опосредованных стратегий.

Дополнительное сочетание PDX-моделей с частично или полностью человекоизированной иммунной системой открывает возможность комплексной оценки не только противоопухолевой эффективности, но и потенциальной токсичности TCR-T-клеток, включая эффекты on-target/off-tumor и влияние опухолевого микроокружения на функциональное состояние эффекторных клеток. Такой подход создаёт основу для изучения *in vivo* поведения TCR-T-клеток, включая их персистенцию, тканевое распределение и, в ограниченной степени, фармакокинетические характеристики, что является критически важным этапом при переходе от доклинических исследований к клиническим испытаниям.

В перспективе использование PDX-моделей также предоставляет перспективную платформу для оценки комбинированных терапевтических стратегий, включая сочетание TCR-T-клеток с иммуномодулирующими агентами, ингибиторами контрольных точек иммунного ответа или стандартными химиотерапевтическими препаратами. Такой подход позволит не только повысить противоопухолевую эффективность, но и оптимизировать режимы терапии, направленные на преодоление иммунной супрессии и поддержание долгосрочной функциональной активности TCR-T-клеток.

### **Ограничения исследования и перспективы дальнейшего развития**

Несмотря на выраженную противоопухолевую активность анти-HER2 TCR-T-клеток, продемонстрированную в *in vitro* и *in vivo* моделях, полученные результаты следует интерпретировать с учётом ряда ограничений. В частности, используемые *in vitro* системы не в полной мере воспроизводят сложную архитектуру солидной опухоли и особенности опухолевого микроокружения, включая влияние стромальных компонентов, гипоксии и иммунорегуляторных факторов. Кроме того, применение иммунодефицитных моделей на мышах SCID не позволяет оценить вклад эндогенной иммунной системы, а также потенциальные механизмы иммунной регуляции и взаимодействия TCR-T-клеток с другими популяциями иммунных клеток, что может иметь значение для клинической эффективности и безопасности терапии.

В то же время указанные ограничения не умаляют значимости полученных данных, поскольку использованные экспериментальные модели являются общепринятым и

необходимым этапом доклинической оценки эффективности TCR-T-клеточной терапии.

Перспективы дальнейших исследований логично вытекают из полученных экспериментальных данных и связаны, прежде всего, с углублённой оценкой безопасности и функциональной устойчивости анти-HER2 TCR-T-клеток. Учитывая, что HER2 относится к опухоль-ассоциированным антигенам, экспрессия которых может в низких уровнях сохраняться в нормальных тканях, особое значение приобретает детальный анализ потенциальной перекрёстной реактивности TCR с гомологичными пептидами, представленными в контексте HLA-A\*02. Такой подход позволит дополнительно подтвердить антигенную специфичность и минимизировать риск внеопухолевого токсичности.

Важным направлением дальнейших исследований является изучение долгосрочной персистенции и функционального состояния анти-HER2 TCR-T-клеток, включая оценку признаков истощения, сохранения эффекторных функций и способности к повторной активации при длительном антигенном воздействии. Эти параметры имеют ключевое значение для оценки терапевтической эффективности TCR-T-клеток при лечении солидных опухолей, характеризующихся хронической антигенной стимуляцией.

С точки зрения трансляционного потенциала, дальнейшее развитие предложенного подхода предполагает оптимизацию протоколов масштабируемого производства TCR-T-клеток и адаптацию разработанной платформы к требованиям GMP. Кроме того, результаты настоящего исследования обосновывают необходимость разработки чётких критериев отбора пациентов, включая количественную оценку экспрессии HER2 и обязательное HLA-типирование.

При разработке TCR-T терапии ключевым вызовом остается минимизация риска иммунологических осложнений, таких как on-target/off-tumor токсичность, цитокиновый шторм и аутоиммунные реакции. Важным направлением является разработка систем безопасности, включая использование «спасательных» генов, регулируемых промоторами, или механизмы условного уничтожения трансдуцированных клеток (suicide genes). Кроме того, мониторинг иммунного ответа пациента с использованием современных биомаркеров позволит своевременно выявлять и корректировать нежелательные реакции, что существенно повысит безопасность терапии.

## Заключение

В этом исследовании представлена успешная разработка и доклиническая валидация Т-клеточной терапии на основе генетически-модифицированных Т-клеток с рецепторами, нацеленными на иммуногенный эпитоп антигена HER2/neu, KIFGSLAFL (KIF) (TCR-T клетки) демонстрирующей значительный терапевтический потенциал в отношении HER2-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-T-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-T-клеток при сохранении высокой жизнеспособности клеток.

Функциональная оценка показала, что полученные TCR-T-клетки продемонстрировали высокую специфичность и антиген-зависимую активность. *In vitro* TCR-T-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 на моделях ксенотрансплантатов.

Анализ секрета выявил повышенную выработку ключевых цитокинов и цитотоксических молекул, включая IL-2, гранзим В, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ , что указывает на мощные эффекторные реакции. Параллельное транскриптомное профилирование подтвердило активацию цитотоксических, иммунных и апоптозных путей, подчеркнув способность клеток к эффективному распознаванию HER2/neu и противоопухолевой активности. Примечательно, что дифференциация TCR-T-клеток в дубль-позитивную (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) популяцию с высоким уровнем экспрессии GZMA, GZMB, GNLY, PRF1 и TNF- $\alpha$  свидетельствует об усилении эффекторных функций, что коррелирует с их наблюдаемой

терапевтической эффективностью. Эти результаты подчеркивают большой потенциал анти-HER2 TCR-T-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-положительных злокачественных новообразований, открывая возможности для персонализированной иммунотерапии против широкого спектра опухоль-специфических или опухоль-ассоциированных антигенов.

При этом важно учитывать ограничения подхода. Несмотря на обнадеживающую специфичность и эффективность, использование одного клонотипа TCR может ограничивать эффективность против гетерогенных опухолей. Для преодоления этой проблемы целесообразно рассматривать комбинаторные стратегии, включающие сочетание TCR-T-клеток с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа, другими таргетными препаратами или стандартной противоопухолевой терапией. Кроме того, повышенная секреция иммуномодулирующих цитокинов (IL-2, IFN- $\gamma$ ) и цитотоксических молекул (гранзима B) позволяет TCR-T-клеткам модулировать опухолевое микроокружение, что может быть использовано для повышения их клинической эффективности.

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 иммунотерапии TCR-T-клетками.

## 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 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-Т-клеток с эффективностью трансдукции более 30% при сохранении жизнеспособности свыше 95%.
4. Подтверждена высокая цитотоксичность TCR-Т-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- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ . Транскриптомный анализ показал активацию путей цитотоксичности и активации иммунитета, а также повышенную экспрессию ключевых эффекторных цитотоксических молекул: гранзимов (GZMA, GZMB), гранулизина (GNLY), перфорины-1 (PRF1) и TNF- $\alpha$ .
6. Продемонстрирована противоопухолевая активность TCR-Т-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 цитированной литературы

1. Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Soerjomataram I., Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA Cancer J. Clin.* – 2024. – Vol. 74. – № 3. – P. 229–263.
2. Zitvogel L., Galluzzi L., Smyth M.J., Kroemer G. Mechanism of Action of Conventional and Targeted Anticancer Therapies: Reinstating Immunosurveillance // *Immunity.* – 2013. – Vol. 39. – № 1. – P. 74–88.
3. Sharma P., Allison J.P. The future of immune checkpoint therapy // *Science (1979).* – 2015. – Vol. 348. – № 6230. – P. 56–61.
4. Mellman I., Coukos G., Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age // *Nature.* – 2011. – Vol. 480. – № 7378. – P. 480–489.
5. June C.H., O'Connor R.S., Kawalekar O.U., Ghassemi S., Milone M.C. CAR T cell immunotherapy for human cancer // *Science (1979).* – 2018. – Vol. 359. – № 6382. – P. 1361–1365.
6. Tsimberidou A.M., Van Morris K., Vo H.H., Eck S., Lin Y.F., Rivas J.M., Andersson B.S. T-cell receptor-based therapy: an innovative therapeutic approach for solid tumors // *Journal of Hematology & Oncology 2021 14:1.* BioMed Central, – 2021. – Vol. 14. – № 1. – P. 1–22.
7. Davis M.M., Bjorkman P.J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition // *Nature.* Nature Publishing Group, – 1988. – Vol. 334. – № 6181. – P. 395–402.
8. Wherry E.J., Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion // *Nature Reviews Immunology 2015 15:8.* Nature Publishing Group, – 2015. – Vol. 15. – № 8. – P. 486–499.
9. Gajewski T.F., Schreiber H., Fu Y.X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment // *Nature Immunology 2013 14:10.* Nature Publishing Group, – 2013. – Vol. 14. – № 10. – P. 1014–1022.
10. Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L. Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/neu Oncogene // *Science (1979).* American Association for the Advancement of Science, – 1987. – Vol. 235. – № 4785. – P. 182–191.
11. Alrhoun S., Sennikov S. 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 2022, Vol. 14, Page 6173.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute, – 2022. – Vol. 14. – № 24. – P. 6173.
12. Piccart M.J., Di Leo A., Hamilton A. HER2 // *Eur. J. Cancer.* StatPearls Publishing, – 2021. – Vol. 36. – № 14. – P. 1755–1761.
13. Iqbal N., Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications // *Mol. Biol. Int.* John Wiley & Sons, Ltd, – 2014. – Vol. 2014. – № 1. – P. 852748.
14. Mitri Z., Constantine T., O'regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy // *Chemother. Res. Pract.* Hindawi Publishing Corporation, – 2012. – Vol. 2012.
15. Pils D., Pinter A., Reibenwein J., Alfanz A., Horak P., Schmid B.C., Hefler L., Horvat R., Reinthaller A., Zeillinger R., Krainer M. In ovarian cancer the prognostic influence of HER2/neu is not dependent on the CXCR4/SDF-1 signalling pathway // *British Journal of Cancer 2007 96:3.* Nature Publishing Group, – 2007. – Vol. 96. – № 3. – P. 485–491.
16. Mitri Z., Constantine T., O'Regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy // *Chemother. Res. Pract.* Hindawi Limited, – 2012. – Vol. 2012. – P. 743193.
17. Dashyan G.A.D., Dzheljalov E.S.D., Konstantinova V.V.K., Gronskaya Yu.A.G., Murskikh A.D.M., Akhmedov R.M.A., Tyusenko A.E.T., Olchonova A.A.O., Dyakonenko Z.V.D., Sereda O.A.S., Belousov A.M.B. Primary resistance to anti-HER2 therapy: mechanisms of development and ways to overcome // *Pharmateca. Bionika Media,* – 2023. – Vol. 11\_2023. – P. 94–100.
18. Hinrichs C.S. Cell-based molecularly targeted therapy: targeting oncoproteins with T cell receptor gene therapy // *J. Clin. Invest.* American Society for Clinical Investigation, – 2018. – Vol. 128. – № 4. – P. 1261.
19. Ellis G.I., Sheppard N.C., Riley J.L. Genetic engineering of T cells for immunotherapy // *Nat. Rev. Genet.* Nature Research, – 2021. – Vol. 22. – № 7. – P. 427.
20. Davis M.M., Bjorkman P.J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition // *Nature.* – 1988. –

- Vol. 334. – № 6181. – P. 395–402.
21. Li J., Zhang Y., Fu T., Xing G., Cai H., Li K., Xu Y., Tong Y. Clinical advances and challenges associated with TCR-T cell therapy for cancer treatment // *Front. Immunol. Frontiers Media SA*, – 2024. – Vol. 15. – P. 1487782.
  22. Kuznetsova M., Lopatnikova J., Shevchenko J., Silkov A., Maksyutov A., Sennikov S. Cytotoxic Activity and Memory T Cell Subset Distribution of in vitro-Stimulated CD8+ T Cells Specific for HER2/neu Epitopes // *Front. Immunol. Frontiers Media S.A.*, – 2019. – Vol. 10. – № MAY. – P. 442609.
  23. Hoffmann M.M., Slansky J.E. T cell receptor affinity in the age of cancer immunotherapy // *Mol. Carcinog. John Wiley and Sons Inc.*, – 2020. – Vol. 59. – № 7. – P. 862.
  24. Akiyama T., Sudo C., Ogawara H., Toyoshima K., Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 gene: A 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity // *Science (1979)*. – 1986. – Vol. 232. – № 4758. – P. 1644–1646.
  25. Stern D.F., Heffernan P.A., Weinberg R.A. p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity // *Mol. Cell. Biol. American Society for Microbiology*, – 1986. – Vol. 6. – № 5. – P. 1729–1740.
  26. Fukushima S.-I., Matsubara K.-I., Yoshida, M., Sasaki M., Suzuki T., Semba K., Toyoshima K., Yamamoto T. Localization of a Novel v-erbB-Related Gene, c-erbB-2, on Human Chromosome 17 and Its Amplification in a Gastric Cancer Cell Line // *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*. – 1986. – Vol. 6. – № 3. 955–958 p.
  27. Nelson E.L. HER2/neu: an increasingly important therapeutic target. Part 1: basic biology & therapeutic armamentarium // *Clin. Investig. (Lond)*. – 2014. – Vol. 4. – № 7. – P. 649–671.
  28. Tobias J., Garner-Spitzer E., Drinić M., Wiedermann U. Vaccination against Her-2/neu, with focus on peptide-based vaccines // *ESMO Open. Elsevier B.V.*, – 2022. – Vol. 7. – № 1.
  29. Klapper L.N., Glathe S., Vaisman N., Hynes N.E., Andrews G.C., Sela M., Yarden Y. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors // *Cell Biology*. – 1999. – Vol. 96. 4995–5000 p.
  30. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: Signalling mechanisms and therapeutic opportunities // *Eur. J. Cancer. Elsevier Ltd*, – 2001. – Vol. 37. – № SUPPL. 4. – P. 3–8.
  31. Moasser M.M. The oncogene HER2: Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis // *Oncogene*. – 2007. – Vol. 26. – № 45. – P. 6469–6487.
  32. Hynes N.E., MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 21. – № 2. – P. 177–184.
  33. Choi S., Kim M., Kim M., Choi S., Kim M., Kim M. The Role of HER2 in Cancer and Its Influence on the Tumor Microenvironment // *HER2 - Role in Cancer [Working Title]. IntechOpen*, – 2025.
  34. Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A., Holt J.A., Wong S.G., Keith D.E., Levin W.J., Stuart S.G., Udove J., Ullrich A., Press M.F. Studies of the HER-2/neu Proto-Oncogene in Human Breast and Ovarian Cancer // *Science (1979). American Association for the Advancement of Science*, – 1989. – Vol. 244. – № 4905. – P. 707–712.
  35. Hynes N.E., Lane H.A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors // *Nature Reviews Cancer 2005 5:5. Nature Publishing Group*, – 2005. – Vol. 5. – № 5. – P. 341–354.
  36. Ahmed S., Sami A., Xiang J. HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer // *Breast Cancer. Springer Japan*, – 2015. – Vol. 22. – № 2. – P. 101–116.
  37. Kunte S., Abraham J., Montero A.J. Novel HER2-targeted therapies for HER2-positive metastatic breast cancer // *Cancer. John Wiley and Sons Inc*, – 2020. – Vol. 126. – № 19. – P. 4278–4288.
  38. Nuciforo P., Thyparambil S., Aura C., Garrido-Castro A., Vilaro M., Peg V., Jimenez J., Vicario R., Cecchi F., Hoos W., Burrows J., Hembrough T., Ferreres J.C., Perez-Garcia J., Arribas J., Cortes J., Scaltriti M. High HER2 protein levels correlate with increased survival in breast cancer patients treated with anti-HER2 therapy // *Mol. Oncol. No longer published by Elsevier*, – 2016. – Vol. 10. – № 1. – P. 138–147.
  39. Rexer B.N., Arteaga C.L. Intrinsic and acquired resistance to HER2-targeted therapies in HER2 gene-amplified breast cancer: mechanisms and clinical implications // *Crit. Rev. Oncog. Crit Rev Oncog*, – 2012. – Vol. 17. – № 1. – P. 1–16.
  40. CE G., J F., D L., S C., CG R., T P., A J.-G., J C., A C., B K., D S., M C., N D., M B., C O., SD R., S S., D C. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer // *N. Engl. J. Med. N Engl J Med*, – 2006. – Vol. 355. – № 26. – P. 45.
  41. Nahta R., Esteva F.J. Trastuzumab: triumphs and tribulations // *Oncogene. Oncogene*, – 2007. – Vol. 26. – № 25. – P. 3637–3643.

42. Moreno V., Hernandez T., de Miguel M., Doger B., Calvo E. Adoptive cell therapy for solid tumors: Chimeric antigen receptor T cells and beyond // *Curr. Opin. Pharmacol.* Elsevier, – 2021. – Vol. 59. – P. 70–84.
43. Border E.C., Sanderson J.P., Weissensteiner T., Gerry A.B., Pumphrey N.J. Affinity-enhanced T-cell receptors for adoptive T-cell therapy targeting MAGE-A10: strategy for selection of an optimal candidate // *Oncoimmunology*. Taylor and Francis Inc., – 2018. – Vol. 8. – № 2. – P. e1532759.
44. Rasmussen A.M., Borelli G., Hoel H.J., Lislud K., Gaudernack G., Kvalheim G., Aarvak T. Ex vivo expansion protocol for human tumor specific T cells for adoptive T cell therapy // *J. Immunol. Methods*. – 2010. – Vol. 355. – № 1–2. – P. 52–60.
45. Scardino A., Alves P., Gross D.A., Tourdot S., Graff-Dubois S., Angevin E., Firat H., Chouaib S., Fran, F., Lemonnier F., Nadler L.M., Cardoso A.A., Kosmatopoulos K. Identification of HER-2/neu immunogenic epitopes presented by renal cell carcinoma and other human epithelial tumors.
46. Fisk B., Blevins T.L., Wharton J.T., Ioannides C.G. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic t lymphocyte lines // *Journal of Experimental Medicine*. – 1995. – Vol. 181. – № 6. – P. 2109–2117.
47. Gheybi E., Salmanian A.H., Fooladi A.A.I., Salimian J., Hosseini H.M., Halabian R., Amani J. Immunogenicity of chimeric MUC1-HER2 vaccine against breast cancer in mice // *Iran. J. Basic Med. Sci. Mashhad University of Medical Sciences*, – 2018. – Vol. 21. – № 1. – P. 26.
48. Costa R.L.B., Czerniecki B.J. Clinical development of immunotherapies for HER2+ breast cancer: a review of HER2-directed monoclonal antibodies and beyond // *npj Breast Cancer*. – 2020. – Vol. 6. – № 1.
49. Baselga J., Swain S.M. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3 // *Nat. Rev. Cancer*. *Nat Rev Cancer*, – 2009. – Vol. 9. – № 7. – P. 463–475.
50. Tuen Lee-Hoeflich S., Crocker L., Yao E., Pham T., Munroe X., Hoeflich K.P., Sliwkowski M.X., Stern H.M. A Central Role for HER3 in HER2-Amplified Breast Cancer: Implications for Targeted Therapy // *Cancer Res*. – 2008. – Vol. 68. – № 14. – P. 5878–5887.
51. R K., R Y.-B. The role of HER2 in angiogenesis // *Semin. Oncol.* *Semin Oncol*, – 2001. – Vol. 28. – № 5 Suppl 16. – P. 27–32.
52. Meric-Bernstam F., Johnson A.M., Dumbrava E.E.I., Raghav K., Balaji K., Bhatt M., Murthy R.K., Rodon J., Piha-Paul S.A. Advances in HER2-Targeted Therapy: Novel Agents and Opportunities Beyond Breast and Gastric Cancer // *Clinical Cancer Research*. NIH Public Access, – 2019. – Vol. 25. – № 7. – P. 2033–2041.
53. Vranić S., Bešlija S., Gatalica Z. Targeting HER2 expression in cancer: New drugs and new indications // *Bosn. J. Basic Med. Sci. Association of Basic Medical Sciences of FBiH*, – 2021. – Vol. 21. – № 1. – P. 1–4.
54. Vernimmen D., Gueders M., Pisvin S., Delvenne P., Winkler R. Different mechanisms are implicated in ERBB2 gene overexpression in breast and in other cancers // *Br. J. Cancer*. Nature Publishing Group, – 2003. – Vol. 89. – № 5. – P. 899.
55. Giles K.M., Barker A., Zhang P.M., Epis M.R., Leedman P.J. MicroRNA regulation of growth factor receptor signaling in human cancer cells // *Methods Mol. Biol. Methods Mol Biol*, – 2011. – Vol. 676. – P. 147–163.
56. Kuznetsova M., Lopatnikova J., Khantakova J., Maksyutov R., Maksyutov A., Sennikov S. Generation of populations of antigen-specific cytotoxic T cells using DCs transfected with DNA construct encoding HER2/neu tumor antigen epitopes // *BMC Immunol.* BioMed Central Ltd., – 2017. – Vol. 18. – № 1. – P. 1–13.
57. Peoples G.E., Holmes J.P., Hueman M.T., Mittendorf E.A., Amin A., Khoo S., Dehqanzada Z.A., Gurney J.M., Woll M.M., Ryan G.B., Storrer C.E., Craig D., Ioannides C.G., Ponniah S. Combined clinical trial results of a HER2/neu (E75) vaccine for the prevention of recurrence in high-risk breast cancer patients: U.S. Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02 // *Clin. Cancer Res. Clin Cancer Res*, – 2008. – Vol. 14. – № 3. – P. 797–803.
58. Mittendorf E.A., Storrer C.E., Foley R.J., Harris K., Jama Y., Shriver C.D., Ponniah S., Peoples G.E. Evaluation of the HER2/neu-derived peptide GP2 for use in a peptide-based breast cancer vaccine trial // *Cancer. Cancer*, – 2006. – Vol. 106. – № 11. – P. 2309–2317.
59. Press M.F., Cordon-Cardo C., Slamon D.J. Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. // *Oncogene*. – 1990. – Vol. 5. – № 7. – P. 953–962.
60. Ménard S., Casalini P., Campiglio M., Pupa S.M., Tagliabue E. Role of HER2/neu in tumor progression and therapy // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2004. – Vol. 61. – № 23. – P. 2965–2978.

61. Yan M., Schwaederle M., Arguello D., Millis S.Z., Gatalica Z., Kurzrock R. HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients // *Cancer Metastasis Rev.* Springer, – 2015. – Vol. 34. – № 1. – P. 157.
62. Gupta A., Gupta S., Mani R., Durgapal P., Goyal B., Rajput D., Rao S., Dhar P., Gupta M., Kishore S., Kant R. Expression of Human epidermal growth factor receptor 2, Survivin, Enhancer of zeste homolog -2, Cyclooxygenase-2, p53 and p16 molecular markers in Gall bladder carcinoma // *J. Carcinog.* Wolters Kluwer -- Medknow Publications, – 2021. – Vol. 20. – № 1.
63. Plum P.S., Gebauer F., Krämer M., Alakus H., Berlth F., Chon S.H., Schiffmann L., Zander T., Büttner R., Hölscher A.H., Bruns C.J., Quaas A., Loeser H. HER2/neu (ERBB2) expression and gene amplification correlates with better survival in esophageal adenocarcinoma // *BMC Cancer.* BioMed Central, – 2019. – Vol. 19. – № 1.
64. Bealy M.A., Abugooda A.A., Ahmed R.M.E., Khalil N.A.R., Elasalbi A.M., Mohamed G.E.Y., Eltom F.M., Ahmed H. Patterns of Immunohistochemical Expression of P53, BCL2, PTEN, and HER2/neu Tumor Markers in Specific Breast Cancer Lesions // *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* Hindawi Limited, – 2022. – Vol. 2022.
65. Kwon C.H., Seo H. Il, Kim D.U., Han S.Y., Kim S., Lee S.J., Jeon D.Y. HER2 status based on breast cancer guidelines as a useful prognostic marker of T2 gallbladder cancer // *Eur. J. Surg. Oncol.* Eur J Surg Oncol, – 2022.
66. Yoshikawa D., Ojima H., Iwasaki M., Hiraoka N., Kosuge T., Kasai S., Hirohashi S., Shibata T. Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma // *Br. J. Cancer.* Nature Publishing Group, – 2008. – Vol. 98. – № 2. – P. 418.
67. Lian J., Zhang G., Zhang Y., Liu H., Zhang J., Nan P., Tian W. PD-L1 and HER2 expression in gastric adenocarcinoma and their prognostic significance // *Dig. Liver Dis.* Dig Liver Dis, – 2022. – Vol. 54. – № 10. – P. 1419–1427.
68. Sun L., Schroeder M.C., Hagemann I.S., Pfeifer J.D., Schwarz J.K., Grigsby P.W., Markovina S., Lin A.J. Expression of Potential Biomarker Targets by Immunohistochemistry in Cervical Carcinomas // *Int. J. Gynecol. Pathol.* Int J Gynecol Pathol, – 2022. – Vol. 41. – № 6.
69. Jenkins T.M., Cantrell L.A., Stoler M.H., Mills A.M. HER2 Overexpression and Amplification in Uterine Carcinosarcomas With Serous Morphology // *Am. J. Surg. Pathol.* Am J Surg Pathol, – 2022. – Vol. 46. – № 4. – P. 435–442.
70. Yan M., Parker B.A., Schwab R., Kurzrock R. HER2 aberrations in cancer: Implications for therapy // *Cancer Treatment Reviews.* W.B. Saunders, – 2014. – Vol. 40. – № 6. – P. 770–780.
71. Wang M., Wang X., Li Y., Li Q., Cai S., Li X., Ma M. HER2 status is positively associated with vessel invasion of colorectal cancer: a retrospective large cohort study // *Int. J. Colorectal Dis.* Int J Colorectal Dis, – 2022. – Vol. 37. – № 9. – P. 2061–2067.
72. Pankaj S., Kumari J., Choudhary V., Kumari A., Kumari S., Kumari A., Nazneen S., Madhawi R., Kumar S. Prognostic Value of HER-2/neu Gene Amplification in Epithelial Ovarian Carcinoma // *J. Obstet. Gynaecol. India.* Springer, – 2019. – Vol. 69. – № Suppl 2. – P. 177.
73. Del Campo J.M., Hitt R., Sebastian P., Carracedo C., Lokanatha D., Bourhis J., Temam S., Cupissol D., De Raucourt D., Maroudias N., Nutting C.M., Compton N., Midwinter D., Downie L., Biswas-Baldwin N., El-Hariry I., Harrington K.J. Effects of lapatinib monotherapy: results of a randomised phase II study in therapy-naïve patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck // *British Journal of Cancer* 2011 105:5. Nature Publishing Group, – 2011. – Vol. 105. – № 5. – P. 618–627.
74. Warren E.A.K., Anil J., Castro P.D., Kemnade J., Suzuki M., Hegde M., Hicks J., Yu W., Sandulache V., Sikora A.G. Human epidermal growth factor receptor 2 expression in head and neck squamous cell carcinoma: Variation within and across primary tumor sites, and implications for antigen-specific immunotherapy // *Head Neck.* Head Neck, – 2021. – Vol. 43. – № 7. – P. 1983–1994.
75. Yoshizawa A., Sumiyoshi S., Sonobe M., Kobayashi M., Uehara T., Fujimoto M., Tsuruyama T., Date H., Haga H. HER2 status in lung adenocarcinoma: A comparison of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization (FISH), dual-ISH, and gene mutations // *Lung Cancer.* Elsevier Ireland Ltd, – 2014. – Vol. 85. – № 3. – P. 373–378.
76. Aparicio T., Svrcek M., Zaanani A., Beohou E., Laforest A., Afchain P., Mitry E., Taieb J., Di Fiore F., Gornet J.M., Thiriot-Bidault A., Sobhani I., Malka D., Lecomte T., Locher C., Bonnetain F., Laurent-Puig P. Small bowel adenocarcinoma phenotyping, a clinicobiological prognostic study // *Br. J. Cancer.* Br J Cancer, – 2013. – Vol. 109. – № 12. – P. 3057–3066.
77. Kruger S.F., Lohneis A., Abendroth A., Berger A.W., Etrich T.J., Waidmann O., Kapp M., Steiner B., Kumbrink J., Reischer A., Haas M., Westphalen C.B., Zhang D., Miller-Phillips L., Burger P.J., Kobold

- S., Werner J., Subklewe M., von Bergwelt-Baildon M. et al. Prognosis and tumor biology of pancreatic cancer patients with isolated lung metastases: translational results from the German multicenter AIO-YMO-PAK-0515 study // *ESMO Open*. Elsevier, – 2022. – Vol. 7. – № 1. – P. 11.
78. Vivaldi C., Fornaro L., Ugolini C., Niccoli C., Musettini G., Pecora I., Insilla A.C., Salani F., Pasquini G., Catanese S., Lencioni M., Masi G., Campani D., Fontantini G., Falcone A., Vasile E. HER2 Overexpression as a Poor Prognostic Determinant in Resected Biliary Tract Cancer // *Oncologist*. Oxford University Press, – 2020. – Vol. 25. – № 10. – P. 886.
  79. Xiao G.Q., Nguyen E., Unger P.D., Sherrod A.E. Comparative expression of immunohistochemical biomarkers in cribriform and pattern 4 non-cribriform prostatic adenocarcinoma // *Exp. Mol. Pathol*. Academic Press, – 2020. – Vol. 114. – P. 104400.
  80. Neto A.S., Tobias-Machado M., Wroclawski M.L., Fonseca F.L.A., Teixeira G.K., Amarante R.D.M., Wroclawski E.R., Del Giglio A. HER-2/neu Expression in Prostate Adenocarcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis // *J. Urol*. Wolters Kluwer Philadelphia, PA, – 2010. – Vol. 184. – № 3. – P. 842–850.
  81. Panvichian R., Tantiwettrueangdet A., Angkathunyakul N., Leelaudomlipi S. TOP2A Amplification and Overexpression in Hepatocellular Carcinoma Tissues // *Biomed Res. Int*. Hindawi Limited, – 2015. – Vol. 2015.
  82. Alzeyadi M., Imarah A.A., Khayoon S.Q., Alhamadani I.M. Cytogenetic Analysis of HER2 in Ovarian Cancer Patients by Fluorescence in Situ Hybridization // *European Journal of Engineering Science and Technology*. – 2020. – Vol. 3. – № 1. – P. 1–7.
  83. Inman J.L., Kute T., White W., Pettenati M., Levine E.A. Absence of HER2 overexpression in metastatic malignant melanoma // *J. Surg. Oncol*. John Wiley & Sons, Ltd, – 2003. – Vol. 84. – № 2. – P. 82–88.
  84. Lopes L.F., Bacchi C.E. HER-2 status in gastrointestinal stromal tumor // *Ann. Diagn. Pathol*. Ann Diagn Pathol, – 2008. – Vol. 12. – № 4. – P. 283–285.
  85. Mineo J.F., Bordron A., Baroncini M., Mauraage C.A., Ramirez C., Siminski R.M., Berthou C., Dam Hieu P. Low HER2-expressing glioblastomas are more often secondary to anaplastic transformation of low-grade glioma // *J. Neurooncol*. J Neurooncol, – 2007. – Vol. 85. – № 3. – P. 281–287.
  86. Wang H., Liu C., Han J., Zhen L., Zhang T., He X., Xu E., Li M. HER2 expression in renal cell carcinoma is rare and negatively correlated with that in normal renal tissue // *Oncol. Lett*. Spandidos Publications, – 2012. – Vol. 4. – № 2. – P. 194.
  87. Micke P., Hengstler J.G., Ros E., Bittinger F., Metz T., Gebhard S., Bech K.M., Oesch F., Buhl R. c-erbB-2 Expression in small-cell lung cancer is associated with poor prognosis // *Int. J. Cancer*. John Wiley & Sons, Ltd, – 2001. – Vol. 92. – № 4. – P. 474–479.
  88. Srirajaskanthan R., Shah T., Watkins J., Marelli L., Khan K., Caplin M.E. Expression of the HER-1-4 family of receptor tyrosine kinases in neuroendocrine tumours // *Oncol. Rep*. Spandidos Publications, – 2010. – Vol. 23. – № 4. – P. 909–915.
  89. Sato T., Peiper M., Heinecke A., Zurakowski D., Eisenberger C.F., Hosch S., Knoefel W.T., Izbicki J.R. Expression of HER2/neu does not correlate with survival in soft tissue sarcoma // *Onkologie*. – 2003. – Vol. 26. – № 3. – P. 268–271.
  90. Enkner F., Pichlhöfer B., Zaharie A.T., Kronic M., Holper T.M., Janik S., Moser B., Schlangen K., Neudert B., Walter K., Migschitz B., Müllauer L. Molecular Profiling of Thymoma and Thymic Carcinoma: Genetic Differences and Potential Novel Therapeutic Targets // *Pathology Oncology Research*. Springer, – 2017. – Vol. 23. – № 3. – P. 551.
  91. Mondini M.M., Rich R., Ituarte P., Wong M., Bergman S., Clark O.H., Perrier N.D. HER2 expression in thyroid tumors // *American Surgeon*. – 2003. – Vol. 69. – № 12. – P. 1100–1103.
  92. Stankiewicz E., Prowse D.M., Ng M., Cuzick J., Mesher D., Hiscock F., Lu Y.J., Watkin N., Corbishley C., Lam W., Berney D.M. Alternative HER/PTEN/Akt pathway activation in HPV positive and negative penile carcinomas // *PLoS One*. PLoS One, – 2011. – Vol. 6. – № 3.
  93. Cimpean A., Melnic E., Corlan A., Ceausu A., Raica M. HETEROGENEITY OF C ERB B FAMILY MEMBERS EXPRESSION IS RELATED TO CELL MORPHOLOGY AND IMMUNOPROFILE IN PITUITARY ADENOMAS // *Research and Clinical Medicine*. – 2016.
  94. Alrhoun S., Sennikov S. 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* 2022, Vol. 14, Page 6173. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, – 2022. – Vol. 14. – № 24. – P. 6173.
  95. Schaller G., Bangemann N., Becker C., Bühler H., Opri F., Weitzel H.K. Therapy of metastatic breast cancer with humanized antibodies against the HER2 receptor protein // *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. –

1999. – Vol. 125. – № 8–9. – P. 520–524.
96. Adams G.P., Weiner L.M. Monoclonal antibody therapy of cancer // *Nat. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 23. – № 9. – P. 1147–1157.
  97. Widakowich C., de Castro G., de Azambuja E., Dinh P., Awada A. Review: Side Effects of Approved Molecular Targeted Therapies in Solid Cancers // *Oncologist. Oxford Academic*, – 2007. – Vol. 12. – № 12. – P. 1443–1455.
  98. Yao M., Fu P. Advances in anti-HER2 therapy in metastatic breast cancer // *Chin. Clin. Oncol. AME Publishing Company*, – 2018. – Vol. 7. – № 3. – P. 6–6.
  99. Vrbic S., Vrbic S., Pejic I., Filipovic S., Kocic B., Vrbic M. Current and future anti-HER2 therapy in breast cancer Anti-HER2 therapy in breast cancer // *J BUON.* – 2013. – Vol. 18. – № 1. – P. 5.
  100. Jhaveri K.L., Wang X. V., Makker V., Luoh S.W., Mitchell E.P., Zwiebel J.A., Sharon E., Gray R.J., Li S., McShane L.M., Rubinstein L. V., Patton D., Williams P.M., Hamilton S.R., Conley B.A., Arteaga C.L., Harris L.N., O'Dwyer P.J., Chen A.P. et al. Ado-trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with HER2-amplified tumors excluding breast and gastric/gastroesophageal junction (GEJ) adenocarcinomas: results from the NCI-MATCH trial (EAY131) subprotocol Q // *Annals of Oncology. Elsevier Ltd*, – 2019. – Vol. 30. – № 11. – P. 1821–1830.
  101. Clynes R.A., Towers T.L., Presta L.G., Ravetch J. V. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets // *Nat. Med.* – 2000. – Vol. 6. – № 4. – P. 443–446.
  102. Mohan N., Jiang J., Dokmanovic M., Wu W.J. Trastuzumab-mediated cardiotoxicity: current understanding, challenges, and frontiers // *Antib. Ther. Oxford University Press*, – 2018. – Vol. 1. – № 1. – P. 13.
  103. Zhang H., Burrows F. Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90 // *J. Mol. Med.* – 2004. – Vol. 82. – № 8. – P. 488–499.
  104. Capelan M., Pugliano L., De Azambuja E., Bozovic I., Saini K.S., Sotiriou C., Loi S., Piccart-Gebhart M.J. Pertuzumab: New hope for patients with HER2-positive breast cancer // *Annals of Oncology.* – 2013. – Vol. 24. – № 2. – P. 273–282.
  105. von Minckwitz G., Procter M., de Azambuja E., Zardavas D., Benyunes M., Viale G., Suter T., Arahmani A., Rouchet N., Clark E., Knott A., Lang I., Levy C., Yardley D.A., Bines J., Gelber R.D., Piccart M., Baselga J. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer // *New England Journal of Medicine.* – 2017. – Vol. 377. – № 2. – P. 122–131.
  106. Esparís-Ogando A., Montero J., Arribas J., Ocaña A., Pandiella A. Targeting the EGF/HER Ligand-Receptor System in Cancer // *Curr. Pharm. Des. Bentham Science Publishers Ltd.*, – 2016. – Vol. 22. – № 39. – P. 5887–5898.
  107. Amiri-Kordestani L., Wedam S., Zhang L., Tang S., Tilley A., Ibrahim A., Justice R., Pazdur R., Cortazar P. First FDA approval of neoadjuvant therapy for breast cancer: Pertuzumab for the treatment of patients with HER2-positive breast cancer // *Clinical Cancer Research.* – 2014. – Vol. 20. – № 21. – P. 5359–5364.
  108. Baselga J., Cortés J., Kim S.-B., Im S.-A., Hegg R., Im Y.-H., Roman L., Pedrini J.L., Pienkowski T., Knott A., Clark E., Benyunes M.C., Ross G., Swain S.M. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer // *N. Engl. J. Med. N Engl J Med*, – 2012. – Vol. 366. – № 2. – P. 109–119.
  109. Rugo H.S., Im S.A., Cardoso F., Cortés J., Curigliano G., Musolino A., Pegram M.D., Wright G.S., Saura C., Escrivá-De-Romaní S., De Laurentiis M., Levy C., Brown-Glaberman U., Ferrero J.M., De Boer M., Kim S.B., Petráková K., Yardley D.A., Freedman O. et al. Efficacy of Margetuximab vs Trastuzumab in Patients with Pretreated ERBB2-Positive Advanced Breast Cancer: A Phase 3 Randomized Clinical Trial // *JAMA Oncol.* – 2021. – Vol. 7. – № 4. – P. 573–584.
  110. Tarantino P., Morganti S., Uliano J., Giugliano F., Crimini E., Curigliano G. Margetuximab for the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer // <https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1856812>. Taylor & Francis, – 2020. – Vol. 21. – № 2. – P. 127–133.
  111. Royce M., Osgood C.L., Amatya A.K., Fiero M.H., Chang C.J.G., Ricks T.K., Shetty K.A., Kraft J., Qiu J., Song P., Charlab R., Yu J., King K.E., Rastogi A., Janelsins B., Weinberg W.C., Clouse K., Borders-Hemphill V., Brown L. et al. FDA Approval Summary: Margetuximab plus Chemotherapy for Advanced or Metastatic HER2-Positive Breast Cancer // *Clinical Cancer Research. American Association for Cancer Research (AACR)*, – 2022. – Vol. 28. – № 8. – P. 1487–1492.
  112. Nordstrom J.L., Gorlatov S., Zhang W., Yang Y., Huang L., Burke S., Li H., Ciccarone V., Zhang T., Stavenhagen J., Koenig S., Stewart S.J., Moore P.A., Johnson S., Bonvini E. Anti-tumor activity and toxicokinetics analysis of MGAH22, an anti-HER2 monoclonal antibody with enhanced Fcγ receptor

- binding properties. – 2011.
113. Nahta R., Esteva F.J. HER2 therapy: Molecular mechanisms of trastuzumab resistance // *Breast Cancer Research*. – 2006. – Vol. 8. – № 6. – P. 215.
  114. Scaltriti M., Rojo F., Ocana A., Anido J., Guzman M., Cortes J., Di Cosimo S., Matias-Guiu X., Ramon y Cajal S., Arribas J., Baselga J. Expression of p95HER2, a Truncated Form of the HER2 Receptor, and Response to Anti-HER2 Therapies in Breast Cancer // *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. – 2007. – Vol. 99. – № 8. – P. 628–638.
  115. Sergina N. V., Rausch M., Wang D., Blair J., Hann B., Shokat K.M., Moasser M.M. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3 // *Nature*. – 2007. – Vol. 445. – № 7126. – P. 437–441.
  116. Dhatchinamoorthy K., Colbert J.D., Rock K.L. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation // *Front. Immunol. Frontiers Media S.A.*, – 2021. – Vol. 12.
  117. Chabner B.A., Roberts T.G. Chemotherapy and the war on cancer // *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, – 2005. – Vol. 5. – № 1. – P. 65–72.
  118. Chari R.V.J., Miller M.L., Widdison W.C. Antibody-drug conjugates: An emerging concept in cancer therapy // *Angew. Chem. Int. Ed. Wiley-VCH Verlag*, – 2014. – Vol. 53. – № 15. – P. 3796–3827.
  119. Beck A., Goetsch L., Dumontet C., Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates // *Nat. Rev. Drug Discov. Nature Publishing Group*, – 2017. – Vol. 16. – № 5. – P. 315–337.
  120. Peters C., Brown S. Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics // *Biosci. Rep. Portland Press Ltd*, – 2015. – Vol. 35. – № 4.
  121. Pernas S., Tolaney S.M. HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance // *Ther. Adv. Med. Oncol. SAGE Publications*, – 2019. – Vol. 11.
  122. Wynn C.S., Tang S.-C.C. Anti-HER2 therapy in metastatic breast cancer: many choices and future directions // *Cancer and Metastasis Reviews*. – 2022. – № 1.
  123. Schlam I., Swain S.M. HER2-positive breast cancer and tyrosine kinase inhibitors: the time is now // *npj Breast Cancer*. – 2021. – Vol. 7. – № 1.
  124. Lambert J.M., Chari R.V.J. Ado-trastuzumab emtansine (T-DM1): An antibody-drug conjugate (ADC) for HER2-positive breast cancer // *J. Med. Chem. American Chemical Society*, – 2014. – Vol. 57. – № 16. – P. 6949–6964.
  125. Tong J.T.W., Harris P.W.R., Brimble M.A., Kavianinia I. An insight into fda approved antibody-drug conjugates for cancer therapy // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – № 19.
  126. Li L., Zhang D., Liu B., Lv D., Zhai J., Guan X., Yi Z., Ma F., Wang N. Antibody-drug conjugates in HER2-positive breast cancer // *Chin. Med. J. (Engl). Lippincott Williams and Wilkins*, – 2022. – Vol. 135. – № 3. – P. 261–267.
  127. Modi S., Park H., Murthy R.K., Iwata H., Tamura K., Tsurutani J., Moreno-Aspitia A., Doi T., Sagara Y., Redfern C., Krop I.E., Lee C., Fujisaki Y., Sugihara M., Zhang L., Shahidi J., Takahashi S. Antitumor Activity and Safety of Trastuzumab Deruxtecan in Patients With HER2-Low-Expressing Advanced Breast Cancer: Results From a Phase Ib Study // *Journal of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology*, – 2020. – Vol. 38. – № 17. – P. 1887.
  128. Nadal-Serrano M., Morancho B., Escrivá-de-Romaní S., Bernadó Morales C., Luque A., Escorihuela M., Espinosa Bravo M., Peg V., Dijcks F.A., Dokter W.H.A., Cortés J., Saura C., Arribas J. The Second Generation Antibody-Drug Conjugate SYD985 Overcomes Resistances to T-DM1 // *Cancers (Basel). MDPI AG*, – 2020. – Vol. 12. – № 3. – P. 670.
  129. Spector N., Xia W., El-Hariry I., Yarden Y., Bacus S. HER2 therapy. Small molecule HER-2 tyrosine kinase inhibitors // *Breast Cancer Research*. – 2007. – Vol. 9. – № 2. – P. 205.
  130. Xuhong J.-C., Qi X.-W., Zhang Y., Jiang J. Review Article Mechanism, safety and efficacy of three tyrosine kinase inhibitors lapatinib, neratinib and pyrotinib in HER2-positive breast cancer // *Am J Cancer Res*. – 2019. – Vol. 9. – № 10. – P. 2103–2119.
  131. Murthy R.K., Loi S., Okines A., Paplomata E., Hamilton E., Hurvitz S.A., Lin N.U., Borges V., Abramson V., Anders C., Bedard P.L., Oliveira M., Jakobsen E., Bachelot T., Shachar S.S., Müller V., Braga S., Duhoux F.P., Greil R. et al. Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer // *New England Journal of Medicine. Massachusetts Medical Society*, – 2020. – Vol. 382. – № 7. – P. 597–609.
  132. Shah M., Wedam S., Cheng J., Fiero M.H., Xia H., Li F., Fan J., Zhang X., Yu J., Song P., Chen W., Ricks T.K., Chen X.H., Goldberg K.B., Gong Y., Pierce W.F., Tang S., Theoret M.R., Pazdur R. et al. FDA Approval summary: Tucatinib for the treatment of patients with advanced or metastatic HER2-

- positive breast cancer // *Clinical Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc., – 2021. – Vol. 27. – № 5. – P. 1220–1226.
133. Ryan Q., Ibrahim A., Cohen M.H., Johnson J., Ko C., Sridhara R., Justice R., Pazdur R. FDA Drug Approval Summary: Lapatinib in Combination with Capecitabine for Previously Treated Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER-2 // *Oncologist*. Oxford Academic, – 2008. – Vol. 13. – № 10. – P. 1114–1119.
  134. Arab A., Yazdian-Robati R., Behravan J. HER2-Positive Breast Cancer Immunotherapy: A Focus on Vaccine Development // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. – 2020. – Vol. 68. – № 1. – P. 2.
  135. Fuentes-Antrás J., Guevara-Hoyer K., Baliu-Piqué M., García-Sáenz J.Á., Pérez-Segura P., Pandiella A., Ocaña A. Adoptive Cell Therapy in Breast Cancer: A Current Perspective of Next-Generation Medicine // *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A., – 2020. – Vol. 10.
  136. Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J., Schreiber R.D. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape // *Nat. Immunol. Nat Immunol*, – 2002. – Vol. 3. – № 11. – P. 991–998.
  137. Bernhard H., Neudorfer J., Gebhard K., Conrad H., Hermann C., Nährig J., Falko ·, Weber W., Busch D.H., Peschel C., Fend F., Weber W., Busch D.H., Peschel C. Adoptive transfer of autologous, HER2-specific, cytotoxic T lymphocytes for the treatment of HER2-overexpressing breast cancer // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2007. – Vol. 57. – № 2. – P. 271–280.
  138. Rosenberg S.A., Restifo N.P., Yang J.C., Morgan R.A., Dudley M.E. Adoptive cell transfer: A clinical path to effective cancer immunotherapy // *Nat. Rev. Cancer. Nat Rev Cancer*, – 2008. – Vol. 8. – № 4. – P. 299–308.
  139. Sadelain M., Rivière I., Riddell S. Therapeutic T cell engineering // *Nature*. Nature Publishing Group, – 2017. – Vol. 545. – № 7655. – P. 423–431.
  140. Bear A.S., Fraietta J.A., Narayan V.K., O’Hara M., Haas N.B. Adoptive Cellular Therapy for Solid Tumors // *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. – 2021. – № 41. – P. 57–65.
  141. Levine B.L., Miskin J., Wonnacott K., Keir C. Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev*. Elsevier Inc., – 2017. – Vol. 4. – P. 92–101.
  142. Salgado R., Denkert C., Demaria S., Sirtaine N., Klauschen F., Pruneri G., Wienert S., Van den Eynden G., Baehner F.L., Penault-Llorca F., Perez E.A., Thompson E.A., Symmans W.F., Richardson A.L., Brock J., Criscitiello C., Bailey H., Ignatiadis M., Floris G. et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: Recommendations by an International TILS Working Group 2014 // *Annals of Oncology*. Oxford University Press, – 2015. – Vol. 26. – № 2. – P. 259–271.
  143. Rosenberg S.A., Packard B.S., Aebersold P.M., Solomon D., Topalian S.L., Toy S.T., Simon P., Lotze M.T., Yang J.C., Seipp C.A., Simpson C., Carter C., Bock S., Schwartzentruber D., Wei J.P., White D.E. Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma // *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, – 1988. – Vol. 319. – № 25. – P. 1676–1680.
  144. Dudley M.E., Wunderlich J.R., Shelton T.E., Even J., Rosenberg S.A. Generation of Tumor-Infiltrating Lymphocyte Cultures for Use in Adoptive Transfer Therapy for Melanoma Patients // *Journal of Immunotherapy. J Immunother*, – 2003. – Vol. 26. – № 4. – P. 332–342.
  145. Radvanyi L.G., Bernatchez C., Zhang M., Fox P.S., Miller P., Chacon J., Wu R., Lizée G., Mahoney S., Alvarado G., Glass M., Johnson V.E., McMannis J.D., Shpall E., Prieto V., Papadopoulos N., Kim K., Homsy J., Bedikian A. et al. Specific lymphocyte subsets predict response to adoptive cell therapy using expanded autologous tumor-infiltrating lymphocytes in metastatic melanoma patients // *Clinical Cancer Research. Clin Cancer Res*, – 2012. – Vol. 18. – № 24. – P. 6758–6770.
  146. Goff S.L., Smith F.O., Klapper J.A., Sherry R., Wunderlich J.R., Steinberg S.M., White D., Rosenberg S.A., Dudley M.E., Yang J.C. Tumor infiltrating lymphocyte therapy for metastatic melanoma: Analysis of tumors resected for TIL // *Journal of Immunotherapy. J Immunother*, – 2010. – Vol. 33. – № 8. – P. 840–847.
  147. Rosenberg S.A., Yang J.C., Sherry R.M., Kammula U.S., Hughes M.S., Phan G.Q., Citrin D.E., Restifo N.P., Robbins P.F., Wunderlich J.R., Morton K.E., Laurencot C.M., Steinberg S.M., White D.E., Dudley M.E. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy // *Clinical Cancer Research. Clin Cancer Res*, – 2011. – Vol. 17. – № 13. – P. 4550–4557.
  148. Hinrichs C.S., Rosenberg S.A. Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer // *Immunol. Rev. Immunol Rev*, – 2014. – Vol. 257. – № 1. – P. 56–71.
  149. Tran E., Turcotte S., Gros A., Robbins P.F., Lu Y.C., Dudley M.E., Wunderlich J.R., Somerville R.P.,

- Hogan K., Hinrichs C.S., Parkhurst M.R., Yang J.C., Rosenberg S.A. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer // *Science* (1979). American Association for the Advancement of Science, – 2014. – Vol. 344. – № 6184. – P. 641–645.
150. Rosenberg S.A., Yannelli J.R., Yang J.C., Topalian S.L., Schwartzentruber D.J., Weber J.S., Parkinson D.R., Seipp C.A., Einhorn J.H., White D.E. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2 // *J. Natl. Cancer Inst. J Natl Cancer Inst.*, – 1994. – Vol. 86. – № 15. – P. 1159–1166.
  151. Dudley M.E., Wunderlich J.R., Yang J.C., Sherry R.M., Topalian S.L., Restifo N.P., Royal R.E., Kammula U., White D.E., Mavroukakis S.A., Rogers L.J., Gracia G.J., Jones S.A., Mangiameli D.P., Pelletier M.M., Gea-Banacloche J., Robinson M.R., Berman D.M., Filie A.C. et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma // *Journal of Clinical Oncology. J Clin Oncol.*, – 2005. – Vol. 23. – № 10. – P. 2346–2357.
  152. Sarnaik A.A., Hamid O., Khushalani N.I., Lewis K.D., Medina T., Kluger H.M., Thomas S.S., Domingo-Musibay E., Pavlick A.C., Whitman E.D., Martin-Algarra S., Corrie P., Curti B.D., Oláh J., Lutzky J., Weber J.S., Larkin J.M.G., Shi W., Takamura T. et al. Lifileucel, a Tumor-Infiltrating Lymphocyte Therapy, in Metastatic Melanoma // *Journal of Clinical Oncology. Lippincott Williams and Wilkins*, – 2021. – Vol. 39. – № 24. – P. 2656–2666.
  153. Goff S.L., Dudley M.E., Citrin D.E., Somerville R.P., Wunderlich J.R., Danforth D.N., Zlott D.A., Yang J.C., Sherry R.M., Kammula U.S., Klebanoff C.A., Hughes M.S., Restifo N.P., Langhan M.M., Shelton T.E., Lu L., Kwong M.L.M., Ilyas S., Klemen N.D. et al. Randomized, prospective evaluation comparing intensity of lymphodepletion before adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes for patients with metastatic melanoma // *Journal of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology*, – 2016. – Vol. 34. – № 20. – P. 2389–2397.
  154. Stevanović S., Draper L.M., Langhan M.M., Campbell T.E., Kwong M.L., Wunderlich J.R., Dudley M.E., Yang J.C., Sherry R.M., Kammula U.S., Restifo N.P., Rosenberg S.A., Hinrichs C.S. Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells // *Journal of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology*, – 2015. – Vol. 33. – № 14. – P. 1543–1550.
  155. Tran E., Ahmadzadeh M., Lu Y.C., Gros A., Turcotte S., Robbins P.F., Gartner J.J., Zheng Z., Li Y.F., Ray S., Wunderlich J.R., Somerville R.P., Rosenberg S.A. Immunogenicity of somatic mutations in human gastrointestinal cancers // *Science* (1979). American Association for the Advancement of Science, – 2015. – Vol. 350. – № 6266. – P. 1387–1390.
  156. Loi S., Drubay D., Adams S., Pruneri G., Francis P.A., Lacroix-Triki M., Joensuu H., Dieci M.V., Badve S., Demaria S., Gray R., Munzone E., Lemonnier J., Sotiriou C., Piccart M.J., Kellokumpu-Lehtinen P.L., Vingiani A., Gray K., Andre F. et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers // *Journal of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology*, – 2019. – Vol. 37. – № 7. – P. 559.
  157. Dieci M. V., Criscitiello C., Goubar A., Viale G., Conte P., Guarneri V., Ficarra G., Mathieu M.C., Delaloe S., Curigliano G., Andre F. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: A retrospective multicenter study // *Annals of Oncology. Oxford University Press*, – 2014. – Vol. 25. – № 3. – P. 611–618.
  158. Denkert C., Von Minckwitz G., Brase J.C., Sinn B. V., Gade S., Kronenwett R., Pfitzner B.M., Salat C., Loi S., Schmitt W.D., Schem C., Fisch K., Darb-Esfahan S., Mehta K., Sotiriou C., Wienert S., Klare P., André F., Klauschen F. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers // *Journal of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology*, – 2015. – Vol. 33. – № 9. – P. 983–991.
  159. Disis M.L., Wallace D.R., Gooley T.A., Dang Y., Slota M., Lu H., Coveler A.L., Childs J.S., Higgins D.M., Fintak P.A., Dela Rosa C., Tietje K., Link J., Waisman J., Salazar L.G. Concurrent trastuzumab and HER2/neu-specific vaccination in patients with metastatic breast cancer // *J. Clin. Oncol. J Clin Oncol.*, – 2009. – Vol. 27. – № 28. – P. 4685–4692.
  160. Zacharakis N., Chinnasamy H., Black M., Xu H., Lu Y.C., Zheng Z., Pasetto A., Langhan M., Shelton T., Prickett T., Gartner J., Jia L., Trebska-Mcgowan K., Somerville R.P., Robbins P.F., Rosenberg S.A., Goff S.L., Feldman S.A. Immune recognition of somatic mutations leading to complete durable regression in metastatic breast cancer // *Nat. Med. Nature Publishing Group*, – 2018. – Vol. 24. – № 6. – P. 724–730.

161. Stanton S.E., Disis M.L. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer // *J. Immunother. Cancer. BioMed Central Ltd.*, – 2016. – Vol. 4. – № 1.
162. Varchetta S., Gibelli N., Oliviero B., Nardini E., Gennari R., Gatti G., Silva L.S., Villani L., Tagliabue E., Ménard S., Costa A., Fagnoni F.F. Elements related to heterogeneity of antibody-dependent cell cytotoxicity in patients under trastuzumab therapy for primary operable breast cancer overexpressing Her2 // *Cancer Res. Cancer Res.*, – 2007. – Vol. 67. – № 24. – P. 11991–11999.
163. Adams S., Loi S., Toppmeyer D., Cescon D.W., De Laurentiis M., Nanda R., Winer E.P., Mukai H., Tamura K., Armstrong A., Liu M.C., Iwata H., Ryvo L., Wimberger P., Rugo H.S., Tan A.R., Jia L., Ding Y., Karantza V. et al. Pembrolizumab monotherapy for previously untreated, PD-L1-positive, metastatic triple-negative breast cancer: cohort B of the phase II KEYNOTE-086 study // *Annals of Oncology. Elsevier*, – 2019. – Vol. 30. – № 3. – P. 405–411.
164. Rohaan M.W., Van Den Berg J.H., Kvistborg P., Haanen J.B.A.G. Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: A viable treatment option // *J. Immunother. Cancer. BioMed Central Ltd.*, – 2018. – Vol. 6. – № 1.
165. Mahmud S.A., Manlove L.S., Farrar M.A. Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function // *JAKSTAT. Informa UK Limited*, – 2013. – Vol. 2. – № 1. – P. e23154.
166. Turajlic S., Litchfield K., Xu H., Rosenthal R., McGranahan N., Reading J.L., Wong Y.N.S., Rowan A., Kanu N., Al Bakir M., Chambers T., Salgado R., Savas P., Loi S., Birkbak N.J., Sansregret L., Gore M., Larkin J., Quezada S.A. et al. Insertion-and-deletion-derived tumour-specific neoantigens and the immunogenic phenotype: a pan-cancer analysis // *Lancet Oncol. Lancet Publishing Group*, – 2017. – Vol. 18. – № 8. – P. 1009–1021.
167. Schwartzenuber D.J. Guidelines for the Safe Administration of High-Dose Interleukin-2 // *Journal of Immunotherapy. J Immunother.*, – 2001. – Vol. 24. – № 4. – P. 287–293.
168. Sadelain M., Brentjens R., Rivière I. The basic principles of chimeric antigen receptor design // *Cancer Discov. Cancer Discov.*, – 2013. – Vol. 3. – № 4. – P. 388–398.
169. Eshhar Z., Waks T., Gkoss G., Schindler D.G. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the  $\gamma$  or  $\zeta$  subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, – 1993. – Vol. 90. – № 2. – P. 720–724.
170. Sadelain M., Brentjens R., Rivière I. The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors // *Curr. Opin. Immunol. Curr Opin Immunol.*, – 2009. – Vol. 21. – № 2. – P. 215–223.
171. Kochenderfer J.N., Wilson W.H., Janik J.E., Dudley M.E., Stetler-Stevenson M., Feldman S.A., Maric I., Raffeld M., Nathan D.A.N., Lanier B.J., Morgan R.A., Rosenberg S.A. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19 // *Blood. American Society of Hematology*, – 2010. – Vol. 116. – № 20. – P. 4099–4102.
172. Kalos M., Levine B.L., Porter D.L., Katz S., Grupp S.A., Bagg A., June C.H. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia // *Sci. Transl. Med. Sci Transl Med.*, – 2011. – Vol. 3. – № 95.
173. Maher J., Brentjens R.J., Gunset G., Rivière I., Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR $\zeta$ /CD28 receptor // *Nat. Biotechnol. Nat Biotechnol.*, – 2002. – Vol. 20. – № 1. – P. 70–75.
174. Turtle C.J., Hanafi L.A., Berger C., Gooley T.A., Cherian S., Hudecek M., Sommermeyer D., Melville K., Pender B., Budiarto T.M., Robinson E., Steevens N.N., Chaney C., Soma L., Chen X., Yeung C., Wood B., Li D., Cao J. et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> composition in adult B cell ALL patients // *Journal of Clinical Investigation. American Society for Clinical Investigation*, – 2016. – Vol. 126. – № 6. – P. 2123–2138.
175. Wang X., Rivière I. Clinical manufacturing of CAR T cells: Foundation of a promising therapy // *Mol. Ther. Oncolytics. Nature Publishing Group*, – 2016. – Vol. 3. – P. 16015.
176. Zhao L., Cao Y.J. Engineered T Cell Therapy for Cancer in the Clinic // *Front. Immunol. Frontiers Media S.A.*, – 2019. – Vol. 10. – P. 2250.
177. June C.H., O'Connor R.S., Kawalekar O.U., Ghassemi S., Milone M.C. CAR T cell immunotherapy for human cancer // *Science (1979)*. – 2018. – Vol. 359. – № 6382. – P. 1361–1365.
178. Sadelain M., Brentjens R., Rivière I., Park J. CD19 CAR Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia // *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology (ASCO)*, – 2015. – № 35. – P. e360–e363.
179. Maude S.L., Frey N., Shaw P.A., Aplenc R., Barrett D.M., Bunin N.J., Chew A., Gonzalez V.E., Zheng

- Z., Lacey S.F., Mahnke Y.D., Melenhorst J.J., Rheingold S.R., Shen A., Teachey D.T., Levine B.L., June C.H., Porter D.L., Grupp S.A. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia // *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, – 2014. – Vol. 371. – № 16. – P. 1507–1517.
180. Neelapu S.S., Locke F.L., Bartlett N.L., Lekakis L.J., Miklos D.B., Jacobson C.A., Braunschweig I., Oluwole O.O., Siddiqi T., Lin Y., Timmerman J.M., Stiff P.J., Friedberg J.W., Flinn I.W., Goy A., Hill B.T., Smith M.R., Deol A., Farooq U. et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma // *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, – 2017. – Vol. 377. – № 26. – P. 2531–2544.
  181. Maude S.L., Laetsch T.W., Buechner J., Rives S., Boyer M., Bittencourt H., Bader P., Verneris M.R., Stefanski H.E., Myers G.D., Qayed M., De Moerloose B., Hiramatsu H., Schlis K., Davis K.L., Martin P.L., Nemecek E.R., Yanik G.A., Peters C. et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia // *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, – 2018. – Vol. 378. – № 5. – P. 439–448.
  182. Liu X., Jiang S., Fang C., Li H., Zhang X., Zhang F., June C.H., Zhao Y. Novel T cells with improved in vivo anti-tumor activity generated by RNA electroporation // *Protein Cell*. Higher Education Press, – 2017. – Vol. 8. – № 7. – P. 514–526.
  183. Ahmed N., Brawley V.S., Hegde M., Robertson C., Ghazi A., Gerken C., Liu E., Dakhova O., Ashoori A., Corder A., Gray T., Wu M.F., Liu H., Hicks J., Rainusso N., Dotti G., Mei Z., Grilley B., Gee A. et al. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) - Specific chimeric antigen receptor - Modified T cells for the immunotherapy of HER2-positive sarcoma // *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology, – 2015. – Vol. 33. – № 15. – P. 1688–1696.
  184. Morgan R.A., Yang J.C., Kitano M., Dudley M.E., Laurencot C.M., Rosenberg S.A. Case report of a serious adverse event following the administration of t cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2 // *Molecular Therapy*. Mol Ther, – 2010. – Vol. 18. – № 4. – P. 843–851.
  185. Mittendorf E.A., Holmes J.P., Ponniah S., Peoples G.E. The E75 HER2/neu peptide vaccine // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother, – 2008. – Vol. 57. – № 10. – P. 1511–1521.
  186. June C.H., O'Connor R.S., Kawalekar O.U., Ghassemi S., Milone M.C. CAR T cell immunotherapy for human cancer // *Science* (1979). American Association for the Advancement of Science, – 2018. – Vol. 359. – № 6382. – P. 1361–1365.
  187. Study Details | TAC T-cells for the Treatment of HER2-positive Solid Tumors | [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/study/NCT04727151) [Electronic resource]. URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04727151> (accessed: 26.05.2025).
  188. Clinical Trial: NCT00902044 - My Cancer Genome [Electronic resource]. URL: [https://www.mycancergenome.org/content/clinical\\_trials/NCT00902044/](https://www.mycancergenome.org/content/clinical_trials/NCT00902044/) (accessed: 26.05.2025).
  189. Shah N.N., Lee D.W., Yates B., Yuan C.M., Shalabi H., Martin S., Wolters P.L., Steinberg S.M., Baker E.H., Delbrook C.P., Stetler-Stevenson M., Fry T.J., Stroncek D.F., MacKall C.L. Long-Term Follow-Up of CD19-CAR T-Cell Therapy in Children and Young Adults With B-ALL // *Journal of Clinical Oncology*. Lippincott Williams and Wilkins, – 2021. – Vol. 39. – № 15. – P. 1650–1659.
  190. Gardner R.A., Finney O., Annesley C., Brakke H., Summers C., Leger K., Bleakley M., Brown C., Mgebrouff S., Kelly-Spratt K.S., Hoglund V., Lindgren C., Oron A.P., Li D., Riddell S.R., Park J.R., Jensen M.C. Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults // *Blood*. Blood, – 2017. – Vol. 129. – № 25. – P. 3322–3331.
  191. Cappell K.M., Sherry R.M., Yang J.C., Goff S.L., Vanasse D.A., McIntyre L., Rosenberg S.A., Kochenderfer J.N. Long-Term Follow-Up of Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy // *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology, – 2020. – Vol. 38. – № 32. – P. 3805–3815.
  192. Lee D.W., Santomasso B.D., Locke F.L., Ghobadi A., Turtle C.J., Brudno J.N., Maus M. V., Park J.H., Mead E., Pavletic S., Go W.Y., Eldjerou L., Gardner R.A., Frey N., Curran K.J., Peggs K., Pasquini M., DiPersio J.F., van den Brink M.R.M. et al. ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. Elsevier Inc., – 2019. – Vol. 25. – № 4. – P. 625–638.
  193. Brudno J.N., Kochenderfer J.N. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management // *Blood Rev*. Churchill Livingstone, – 2019. – Vol. 34. – P. 45–55.
  194. Oved J.H., Barrett D.M., Teachey D.T. Cellular therapy: Immune-related complications // *Immunol. Rev*. Immunol Rev, – 2019. – Vol. 290. – № 1. – P. 114–126.
  195. Sterner R.C., Sterner R.M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies // *Blood*

- Cancer Journal 2021 11:4. Nature Publishing Group, – 2021. – Vol. 11. – № 4. – P. 1–11.
196. Martinez M., Moon E.K. CAR T cells for solid tumors: New strategies for finding, infiltrating, and surviving in the tumor microenvironment // *Front. Immunol. Frontiers Media S.A.*, – 2019. – Vol. 10. – № FEB.
  197. Joyce J.A., Fearon D.T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment // *Science (1979). American Association for the Advancement of Science*, – 2015. – Vol. 348. – № 6230. – P. 74–80.
  198. Newick K., O'Brien S., Sun J., Kapoor V., Maceyko S., Lo A., Puré E., Moon E., Albelda S.M. Augmentation of CAR T-cell trafficking and antitumor efficacy by blocking protein kinase a localization // *Cancer Immunol. Res. American Association for Cancer Research Inc.*, – 2016. – Vol. 4. – № 6. – P. 541–551.
  199. Ping Y., Liu C., Zhang Y. T-cell receptor-engineered T cells for cancer treatment: current status and future directions // *Protein Cell. Higher Education Press*, – 2018. – Vol. 9. – № 3. – P. 254–266.
  200. Garber K. Driving T-cell immunotherapy to solid tumors // *Nat. Biotechnol. Nature Publishing Group*, – 2018. – Vol. 36. – № 3. – P. 215–219.
  201. Johnson L.A., Morgan R.A., Dudley M.E., Cassard L., Yang J.C., Hughes M.S., Kammula U.S., Royal R.E., Sherry R.M., Wunderlich J.R., Lee C.C.R., Restifo N.P., Schwarz S.L., Cogdill A.P., Bishop R.J., Kim H., Brewer C.C., Rudy S.F., VanWaes C. et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen // *Blood. Blood*, – 2009. – Vol. 114. – № 3. – P. 535–546.
  202. Harris D.T., Hager M. V., Smith S.N., Cai Q., Stone J.D., Kruger P., Lever M., Dushek O., Schmitt T.M., Greenberg P.D., Kranz D.M. Comparison of T Cell Activities Mediated by Human TCRs and CARs That Use the Same Recognition Domains // *The Journal of Immunology. The American Association of Immunologists*, – 2018. – Vol. 200. – № 3. – P. 1088–1100.
  203. D'Angelo S.P., Melchiori L., Merchant M.S., Bernstein D., Glod J., Kaplan R., Grupp S., Tap W.D., Chagin K., Binder G.K., Basu S., Lowther D.E., Wang R., Bath N., Tipping A., Betts G., Ramachandran I., Navenot J.-M., Zhang H. et al. Antitumor Activity Associated with Prolonged Persistence of Adoptively Transferred NY-ESO-1 c259T Cells in Synovial Sarcoma // *Cancer Discov.* – 2018. – Vol. 8. – № 8. – P. 944–957.
  204. Dai H., Wang Y., Lu X., Han W. Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. – 2016. – Vol. 108. – № 7.
  205. Burton J., Siller-Farfán J.A., Pettmann J., Salzer B., Kutuzov M., van der Merwe P.A., Dushek O. Inefficient exploitation of accessory receptors reduces the sensitivity of chimeric antigen receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, – 2023. – Vol. 120. – № 2. – P. e2216352120.
  206. Sola C., Arnoux T., Chanuc F., Fuseri N., Rossi B., Gauthier L., Leget C., Bonnafous C., Wagtmann N., Morel Y., André. P. Abstract 2342: NKG2A immune checkpoint blockade enhances the anti-tumor efficacy of PD1/PD-L1 inhibitors in a preclinical model // *Cancer Res. American Association for Cancer Research (AACR)*, – 2016. – Vol. 76. – № 14\_Supplement. – P. 2342–2342.
  207. Fry T.J., Shah N.N., Orentas R.J., Stetler-Stevenson M., Yuan C.M., Ramakrishna S., Wolters P., Martin S., Delbrook C., Yates B., Shalabi H., Fountaine T.J., Shern J.F., Majzner R.G., Stroncek D.F., Sabatino M., Feng Y., Dimitrov D.S., Zhang L. et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy // *Nat. Med. Nature Publishing Group*, – 2018. – Vol. 24. – № 1. – P. 20–28.
  208. Roex G., Feys T., Beguin Y., Kerre T., Poiré X., Lewalle P., Vandenberghe P., Bron D., Anguille S. Chimeric Antigen Receptor-T-Cell Therapy for B-Cell Hematological Malignancies: An Update of the Pivotal Clinical Trial Data // *Pharmaceutics 2020, Vol. 12, Page 194. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, – 2020. – Vol. 12. – № 2. – P. 194.
  209. Wachsmann T.L.A., Wouters A.K., Remst D.F.G., Hagedoorn R.S., Meeuwse M.H., van Diest E., Leusen J., Kuball J., Falkenburg J.H.F., Heemskerk M.H.M. Comparing CAR and TCR engineered T cell performance as a function of tumor cell exposure // *Oncoimmunology. Taylor and Francis Ltd.*, – 2022. – Vol. 11. – № 1.
  210. Choe J.H., Williams J.Z., Lim W.A. Engineering T Cells to Treat Cancer: The Convergence of Immuno-Oncology and Synthetic Biology // *Annu. Rev. Cancer Biol. Annual Reviews Inc.*, – 2020. – Vol. 4. – № Volume 4, 2020. – P. 121–139.
  211. Arrieta-Bolaños E., Hernández-Zaragoza D.I., Barquera R. An HLA map of the world: A comparison of HLA frequencies in 200 worldwide populations reveals diverse patterns for class I and class II //

- Front. Genet. Frontiers Media S.A., – 2023. – Vol. 14. – P. 866407.
212. Gonzalez-Galarza F.F., McCabe A., Melo dos Santos E.J., Ghattaoraya G., Jones A.R., Middleton D. Allele Frequency Net Database // *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., – 2024. – Vol. 2809. – P. 19–36.
  213. Cameron B.J., Gerry A.B., Dukes J., Harper J. V., Kannan V., Bianchi F.C., Grand F., Brewer J.E., Gupta M., Plesa G., Bossi G., Vuidepot A., Powlesland A.S., Legg A., Adams K.J., Bennett A.D., Pumphrey N.J., Williams D.D., Binder-Scholl G. et al. Identification of a titin-derived HLA-A1-presented peptide as a cross-reactive target for engineered MAGE A3-directed T cells // *Sci. Transl. Med. Sci Transl Med*, – 2013. – Vol. 5. – № 197.
  214. He W., Cui K., Farooq M.A., Huang N., Zhu S., Jiang D., Zhang X., Chen J., Liu Y., Xu G. TCR-T cell therapy for solid tumors: challenges and emerging solutions // *Front. Pharmacol. Frontiers Media SA*, – 2025. – Vol. 16. – P. 1493346.
  215. Brudno J.N., Kochenderfer J.N. Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: Recognition and management // *Blood. American Society of Hematology*, – 2016. – Vol. 127. – № 26. – P. 3321–3330.
  216. Boon T., Cerottini J.C., Van Den Eynde B., Van Der Bruggen P., Van Pel A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes // *Annu. Rev. Immunol. Annual Reviews Inc.*, – 1994. – Vol. 12. – P. 337–365.
  217. Kawakami Y., Eliyahu S., Delgado C.H., Robbins P.F., Sakaguchi K., Appella E., Yannelli J.R., Adema G.J., Miki T., Rosenberg S.A. Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, – 1994. – Vol. 91. – № 14. – P. 6458–6462.
  218. Riddell S.R., Greenberg P.D. Principles for adoptive T cell therapy of human viral diseases // *Annu. Rev. Immunol. Annual Reviews Inc.*, – 1995. – Vol. 13. – P. 545–586.
  219. Morgan R.A., Dudley M.E., Yu Y.Y.L., Zheng Z., Robbins P.F., Theoret M.R., Wunderlich J.R., Hughes M.S., Restifo N.P., Rosenberg S.A. High Efficiency TCR Gene Transfer into Primary Human Lymphocytes Affords Avid Recognition of Melanoma Tumor Antigen Glycoprotein 100 and Does Not Alter the Recognition of Autologous Melanoma Antigens // *The Journal of Immunology. The American Association of Immunologists*, – 2003. – Vol. 171. – № 6. – P. 3287–3295.
  220. Stone J.D., Kranz D.M. Role of T cell receptor affinity in the efficacy and specificity of adoptive T cell therapies // *Front. Immunol. Front Immunol*, – 2013. – Vol. 4. – № AUG.
  221. Robbins P.F., Kassim S.H., Tran T.L.N., Crystal J.S., Morgan R.A., Feldman S.A., Yang J.C., Dudley M.E., Wunderlich J.R., Sherry R.M., Kammula U.S., Hughes M.S., Restifo N.P., Raffeld M., Lee C.C.R., Li Y.F., El-Gamil M., Rosenberg S.A. A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: Long-term follow-up and correlates with response // *Clinical Cancer Research. American Association for Cancer Research Inc.*, – 2015. – Vol. 21. – № 5. – P. 1019–1027.
  222. Stevanovic S., Helman S.R., Wunderlich J.R., Langhan M.M., Doran S.L., Kwong M.L.M., Somerville R.P.T., Klebanoff C.A., Kammula U.S., Sherry R.M., Yang J.C., Rosenberg S.A., Hinrichs C.S. A Phase II Study of Tumor-infiltrating Lymphocyte Therapy for Human Papillomavirus-associated Epithelial Cancers // *Clinical Cancer Research. American Association for Cancer Research Inc.*, – 2019. – Vol. 25. – № 5. – P. 1486–1493.
  223. Doran S.L., Stevanović S., Adhikary S., Gartner J.J., Jia L., Kwong M.L.M., Faquin W.C., Hewitt S.M., Sherry R.M., Yang J.C., Rosenberg S.A., Hinrichs C.S. T-cell receptor gene therapy for human papillomavirus-associated epithelial cancers: A first-in-human, phase I/II study // *Journal of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology*, – 2019. – Vol. 37. – № 30. – P. 2759–2768.
  224. Linette G.P., Stadtmauer E.A., Maus M. V., Rapoport A.P., Levine B.L., Emery L., Litzky L., Bagg A., Carreno B.M., Cimino P.J., Binder-Scholl G.K., Smethurst D.P., Gerry A.B., Pumphrey N.J., Bennett A.D., Brewer J.E., Dukes J., Harper J., Tayton-Martin H.K. et al. Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma // *Blood*. – 2013. – Vol. 122. – № 6. – P. 863–871.
  225. Leidner R., Sanjuan Silva N., Huang H., Sprott D., Zheng C., Shih Y.-P., Leung A., Payne R., Sutcliffe K., Cramer J., Rosenberg S.A., Fox B.A., Urba W.J., Tran E. Neoantigen T-Cell Receptor Gene Therapy in Pancreatic Cancer // *New England Journal of Medicine. Massachusetts Medical Society*, – 2022. – Vol. 386. – № 22. – P. 2112–2119.
  226. Hong D.S., Van Tine B.A., Biswas S., McAlpine C., Johnson M.L., Olszanski A.J., Clarke J.M., Araujo D., Blumenschein G.R., Kebriaei P., Lin Q., Tipping A.J., Sanderson J.P., Wang R., Trivedi T., Annareddy T., Bai J., Rafail S., Sun A. et al. Autologous T cell therapy for MAGE-A4+ solid cancers in HLA-A\*02+ patients: a phase 1 trial // *Nat. Med. Nature Research*, – 2023. – Vol. 29. – № 1. – P.

- 104–114.
227. Tawara I., Kageyama S., Miyahara Y., Fujiwara H., Nishida T., Akatsuka Y., Ikeda H., Tanimoto K., Terakura S., Murata M., Inaguma Y., Masuya M., Inoue N., Kidokoro T., Okamoto S., Tomura D., Chono H., Nukaya I., Mineno J. et al. Safety and persistence of WT1-specific T-cell receptor gene2transduced lymphocytes in patients with AML and MDS // *Blood*. American Society of Hematology, – 2017. – Vol. 130. – № 18. – P. 1985–1994.
  228. Kean S.J. Afamitresgene Autoleucel: First Approval // *Mol. Diagn. Ther. Adis*, – 2024. – Vol. 28. – № 6. – P. 861–866.
  229. Zhao Q., Ahmed M., Tassev D. V., Hasan A., Kuo T.Y., Guo H.F., O'Reilly R.J., Cheung N.K.V. Affinity maturation of T-cell receptor-like antibodies for Wilms tumor 1 peptide greatly enhances therapeutic potential // *Leukemia*. Nature Publishing Group, – 2015. – Vol. 29. – № 11. – P. 2238–2247.
  230. Keshavarz A., Salehi A., Khosravi S., Shariati Y., Nasrabadi N., Kahrizi M.S., Maghsoodi S., Mardi A., Azizi R., Jamali S., Fotovat F. Recent findings on chimeric antigen receptor (CAR)-engineered immune cell therapy in solid tumors and hematological malignancies // *Stem Cell Research & Therapy* 2022 13:1. BioMed Central, – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 1–22.
  231. Zhang J., Wang L. The emerging world of TCR-T cell trials against cancer: A systematic review // *Technol. Cancer Res. Treat.* SAGE Publications Inc., – 2019. – Vol. 18.
  232. Guedan S., Calderon H., Posey A.D., Maus M. V. Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* Cell Press, – 2019. – Vol. 12. – P. 145–156.
  233. Harris D.T., Kranz D.M. Adoptive T Cell Therapies: A Comparison of T Cell Receptors and Chimeric Antigen Receptors // *Trends Pharmacol. Sci.* Elsevier Ltd, – 2016. – Vol. 37. – № 3. – P. 220–230.
  234. Chandran S.S., Klebanoff C.A. T cell receptor-based cancer immunotherapy: Emerging efficacy and pathways of resistance // *Immunol. Rev.* Blackwell Publishing Ltd, – 2019. – Vol. 290. – № 1. – P. 127–147.
  235. Liu X., Jiang S., Fang C., Yang S., Olalere D., Pequignot E.C., Cogdill A.P., Li N., Ramones M., Granda B., Zhou L., Loew A., Young R.M., June C.H., Zhao Y. Affinity-tuned ErbB2 or EGFR chimeric antigen receptor T cells exhibit an increased therapeutic index against tumors in mice // *Cancer Res.* American Association for Cancer Research Inc., – 2015. – Vol. 75. – № 17. – P. 3596–3607.
  236. Neelapu S.S., Tummala S., Kebriaei P., Wierda W., Gutierrez C., Locke F.L., Komanduri K. V., Lin Y., Jain N., Daver N., Westin J., Gulbis A.M., Loghin M.E., De Groot J.F., Adkins S., Davis S.E., Rezvani K., Hwu P., Shpall E.J. Chimeric antigen receptor T-cell therapy-assessment and management of toxicities // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* Nature Publishing Group, – 2018. – Vol. 15. – № 1. – P. 47–62.
  237. Choi B.D., Maus M. V., June C.H., Sampson J.H. Immunotherapy for glioblastoma: Adoptive T-cell Strategies // *Clinical Cancer Research.* American Association for Cancer Research Inc., – 2019. – Vol. 25. – № 7. – P. 2042–2048.
  238. Willemsen R.A., Weijtens M.E.M., Ronteltap C., Eshhar Z., Gratama J.W., Chames P., Bolhuis R.L.H. Grafting primary human T lymphocytes with cancer-specific chimeric single chain and two chain TCR // *Gene Ther.* Nature Publishing Group, – 2000. – Vol. 7. – № 16. – P. 1369–1377.
  239. Zhang W., Liu L., Su H.F., Liu Q., Shen J., Dai H., Zheng W., Lu Y., Zhang W., Bei Y., Shen P. Chimeric antigen receptor macrophage therapy for breast tumours mediated by targeting the tumour extracellular matrix // *Br. J. Cancer.* Nature Publishing Group, – 2019. – Vol. 121. – № 10. – P. 837–845.
  240. Rohaan M.W., Wilgenhof S., Haanen J.B.A.G. Adoptive cellular therapies: the current landscape // *Virchows Archiv.* Springer Verlag, – 2019. – Vol. 474. – № 4. – P. 449–461.
  241. Xie G., Dong H., Liang Y., Ham J.D., Rizwan R., Chen J. CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer // *EBioMedicine.* Elsevier B.V., – 2020. – Vol. 59.
  242. Yuan M., Wang W., Hawes I., Han J., Yao Z., Bertaina A. Advancements in  $\gamma\delta$ T cell engineering: paving the way for enhanced cancer immunotherapy // *Front. Immunol.* Frontiers Media SA, – 2024. – Vol. 15. – P. 1360237.
  243. Palucka K., Banchereau J. Dendritic-Cell-Based Therapeutic Cancer Vaccines // *Immunity.* Immunity, – 2013. – Vol. 39. – № 1. – P. 38–48.
  244. Shevchenko J.A., Kuznetsova M.S., Khristin A.A., Sidorov S. V., Sennikov S. V. Современная терапия рака молочной железы: от тамоксифена до Т-клеточной инженерии // *Сибирский онкологический журнал.* Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, – 2022. – Vol. 21. – № 5. – P. 109–122.
  245. pandas - Python Data Analysis Library [Electronic resource]. URL: <https://pandas.pydata.org/> (accessed: 27.05.2025).

246. bioinfokit · PyPI [Electronic resource]. URL: <https://pypi.org/project/bioinfokit/> (accessed: 27.05.2025).
247. GitHub - Perik-Zavodskii/TCRscope: TCRscope - a tool for simultaneous multimodal gene expression and clonotype analysis of single T-cells profiled via the BD Rhapsody system. [Electronic resource]. URL: <https://github.com/Perik-Zavodskii/TCRscope> (accessed: 27.05.2025).
248. GitHub - IdoSpringer/ERGO-II: ERGO-II, an updated version of ERGO including more features for TCR-peptide binding prediction [Electronic resource]. URL: <https://github.com/IdoSpringer/ERGO-II> (accessed: 19.07.2024).
249. Codon Optimization (ExpOptimizer) - Online Tools [Electronic resource]. URL: <https://www.novoprolabs.com/tools/codon-optimization> (accessed: 12.06.2024).
250. Kurilin V., Alshevskaya A., Sennikov S. Development of Cell Technologies Based on Dendritic Cells for Immunotherapy of Oncological Diseases // *Biomedicines*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, – 2024. – Vol. 12. – № 3. – P. 699.
251. Kuznetsova M., Lopatnikova J., Khantakova J., Maksyutov R., Maksyutov A., Sennikov S. Generation of populations of antigen-specific cytotoxic T cells using DCs transfected with DNA construct encoding HER2/neu tumor antigen epitopes // *BMC Immunol*. BioMed Central Ltd., – 2017. – Vol. 18. – № 1. – P. 31.
252. Obleukhova I., Kiryishina N., Falaleeva S., Lopatnikova J., Kurilin V., Kozlov V., Vitsin A., Cherkasov A., Kulikova E., Sennikov S. Use of antigen-primed dendritic cells for inducing antitumor immune responses *in vitro* in patients with non-small cell lung cancer // *Oncol. Lett.* – 2017.
253. Shevchenko J.A., Khristin A.A., Kurilin V. V., Kuznetsova M.S., Blinova D.D., Starostina N.M., Sidorov S. V., Sennikov S. V. Autologous dendritic cells and activated cytotoxic T-cells as combination therapy for breast cancer // *Oncol. Rep.* Spandidos Publications, – 2020. – Vol. 43. – № 2. – P. 671–680.
254. IdoSpringer/ERGO-II: ERGO-II, an updated version of ERGO including more features for TCR-peptide binding prediction [Electronic resource]. URL: <https://github.com/IdoSpringer/ERGO-II> (accessed: 12.06.2024).
255. Tickotsky N., Sagiv T., Prilusky J., Shifrut E., Friedman N. McPAS-TCR: a manually curated catalogue of pathology-associated T cell receptor sequences // *Bioinformatics*. Oxford Academic, – 2017. – Vol. 33. – № 18. – P. 2924–2929.
256. McInnes L., Healy J., Astels S. hdbscan: Hierarchical density based clustering // *J. Open Source Softw.* The Open Journal, – 2017. – Vol. 2. – № 11. – P. 205.
257. Immunization with a peptide epitope (p369-377) from HER-2/neu leads to peptide-specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER-2/neu+ tumors - PubMed [Electronic resource]. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9809997/> (accessed: 27.05.2025).
258. Lopatnikova J.A.Ju.A., Shevchenko Yu.A., Filippova J.G.Ju.G., Fisher M.S.M.S., Obleukhova I.A.I.A., Golikova E.A.E.A., Korneev A.A.A.A., Shangina P.A.P.A., Alrhoun S., Perik-Zavodskiy R.Yu., Savostyanova T.T.A., Kurilin V.V.V. V., Sennikov S.V.S. V., Shevchenko J.A., Filippova J.G.Ju.G., Fisher M.S.M.S., Obleukhova I.A.I.A., Golikova E.A.E.A., Korneev A.A.A.A. et al. Multimer-based technologies for the assessment of antigen-specific CD8<sup>+</sup>-lymphocytes // *Immunologiya*. Geotar Media Publishing Group, – 2024. – Vol. 45. – № 6. – P. 777–791.
259. Wulf M.G., Maguire S., Humbert P., Dai N., Bei Y., Nichols N.M., Corrêa I.R., Guan S. Non-templated addition and template switching by Moloney murine leukemia virus (MMLV)-based reverse transcriptases co-occur and compete with each other // *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, – 2019. – Vol. 294. – № 48. – P. 18220–18231.
260. Kumari P., Kaur M., Dindhoria K., Ashford B., Amarasinghe S.L., Thind A.S. Advances in long-read single-cell transcriptomics // *Human Genetics* 2024 143:9. Springer, – 2024. – Vol. 143. – № 9. – P. 1005–1020.
261. Springer I., Besser H., Tickotsky-Moskovitz N., Dvorkin S., Louzoun Y. Prediction of Specific TCR-Peptide Binding From Large Dictionaries of TCR-Peptide Pairs // *Front. Immunol.* Frontiers Media S.A., – 2020. – Vol. 11.
262. Perik-Zavodskii R., Perik-Zavodskaya O., Volynets M., Alrhoun S., Sennikov S. TCRscope: a single-cell multi-omic TCR profiling toolkit // *Frontiers in Bioinformatics*. Frontiers Media SA, – 2025. – Vol. 5. – P. 1641491.
263. Dash P., Fiore-Gartland A.J., Hertz T., Wang G.C., Sharma S., Souquette A., Crawford J.C., Clemens E.B., Nguyen T.H.O., Kedzierska K., La Gruta N.L., Bradley P., Thomas P.G. Quantifiable predictive features define epitope-specific T cell receptor repertoires // *Nature*. Nature Publishing Group, – 2017.

- Vol. 547. – № 7661. – P. 89–93.
264. Glanville J., Huang H., Nau A., Hatton O., Wagar L.E., Rubelt F., Ji X., Han A., Krams S.M., Pettus C., Haas N., Lindestam Arlehamn C.S., Sette A., Boyd S.D., Scriba T.J., Martinez O.M., Davis M.M., Arlehamn C.S.L., Sette A. et al. Identifying specificity groups in the T cell receptor repertoire // *Nature*. Nature Publishing Group, – 2017. – Vol. 547. – № 7661. – P. 94–98.
  265. Puigbo P., Guzman E., Romeu A., Garcia-Vallve S. OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – Vol. 35. – № Web Server. – P. W126–W131.
  266. Szymczak A.L., Workman C.J., Wang Y., Vignali K.M., Dilioglou S., Vanin E.F., Vignali D.A.A. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single “self-cleaving” 2A peptide–based retroviral vector // *Nature Biotechnology* 2004 22:5. Nature Publishing Group, – 2004. – Vol. 22. – № 5. – P. 589–594.
  267. Kadaré G., Haenni A.L. Virus-encoded RNA helicases // *J. Virol. American Society for Microbiology*, – 1997. – Vol. 71. – № 4. – P. 2583–2590.
  268. Zhou Y.J., Xiao Q.X., Jia Yang B. Spoof localized surface plasmons on ultrathin textured MIM ring resonator with enhanced resonances // *Scientific Reports* 2015 5:1. Nature Publishing Group, – 2015. – Vol. 5. – № 1. – P. 1–12.
  269. Guo R., Cao G., Xue R., Kumar D., Chen F., Liu W., Jiang Y., Lu Y., Zhu L., Liang Z., Kuang S., Hu X., Gong C. Exogenous gene can be expressed by a recombinant *Bombyx mori* cytovirus // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Springer Verlag, – 2018. – Vol. 102. – № 3. – P. 1367–1379.
  270. Zufferey R., Dull T., Mandel R.J., Bukovsky A., Quiroz D., Naldini L., Trono D. Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery // *J. Virol. American Society for Microbiology*, – 1998. – Vol. 72. – № 12. – P. 9873–9880.
  271. Zarghampoor F., Azarpira N., Khatami S.R., Behzad-Behbahani A., Foroughmand A.M. Improved translation efficiency of therapeutic mRNA // *Gene*. Elsevier, – 2019. – Vol. 707. – P. 231–238.
  272. Dull T., Zufferey R., Kelly M., Mandel R.J., Nguyen M., Trono D., Naldini L. A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System // *J. Virol. American Society for Microbiology*, – 1998. – Vol. 72. – № 11. – P. 8463–8471.
  273. Burns J.C., Friedmann T., Driever W., Burrascano M., Yee J.K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, – 1993. – Vol. 90. – № 17. – P. 8033–8037.
  274. Cronin J., Zhang X.-Y., Reiser J. Altering the Tropism of Lentiviral Vectors through Pseudotyping // *Curr. Gene Ther.* Bentham Science Publishers Ltd., – 2005. – Vol. 5. – № 4. – P. 387–398.
  275. Merten O.W., Hebben M., Bovolenta C. Production of lentiviral vectors // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* Elsevier Inc., – 2016. – Vol. 3. – P. 16017.
  276. Milone M.C., O’Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors // *Leukemia*. Nature Publishing Group, – 2018. – Vol. 32. – № 7. – P. 1529–1541.
  277. Decker T., Lohmann-Matthes M.L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity // *J. Immunol. Methods. J Immunol Methods*, – 1988. – Vol. 115. – № 1. – P. 61–69.
  278. Korzeniewski C., Callewaert D.M. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity // *J. Immunol. Methods. J Immunol Methods*, – 1983. – Vol. 64. – № 3. – P. 313–320.
  279. Waldmann T.A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: Implications for cancer therapy and vaccine design // *Nat. Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 6. – № 8. – P. 595–601.
  280. Lieberman J. Anatomy of a murder: How cytotoxic T cells and NK cells are activated, develop, and eliminate their targets // *Immunol. Rev. Immunol Rev*, – 2010. – Vol. 235. – № 1. – P. 5–9.
  281. Wang X., Lin Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? // *Acta Pharmacol. Sin. Acta Pharmacol Sin*, – 2008. – Vol. 29. – № 11. – P. 1275–1288.
  282. Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K., Mukherjee S., Ebert B.L., Gillette M.A., Paulovich A., Pomeroy S.L., Golub T.R., Lander E.S., Mesirov J.P. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Proc Natl Acad Sci U S A*, – 2005. – Vol. 102. – № 43. – P. 15545–15550.
  283. Mootha V.K., Lindgren C.M., Eriksson K.F., Subramanian A., Sihag S., Lehar J., Puigserver P., Carlsson E., Ridderstråle M., Laurila E., Houstis N., Daly M.J., Patterson N., Mesirov J.P., Golub T.R., Tamayo P., Spiegelman B., Lander E.S., Hirschhorn J.N. et al. PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes // *Nat. Genet.* Nature Publishing Group, – 2003. – Vol. 34. – № 3. – P. 267–273.

284. Trapnell C. Defining cell types and states with single-cell genomics // *Genome Res.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, – 2015. – Vol. 25. – № 10. – P. 1491–1498.
285. Zheng G.X.Y., Terry J.M., Belgrader P., Ryvkin P., Bent Z.W., Wilson R., Ziraldo S.B., Wheeler T.D., McDermott G.P., Zhu J., Gregory M.T., Shuga J., Montesclaros L., Underwood J.G., Masquelier D.A., Nishimura S.Y., Schnall-Levin M., Wyatt P.W., Hindson C.M. et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells // *Nat. Commun.* Nature Publishing Group, – 2017. – Vol. 8.
286. Kawai Y., Kawana-Tachikawa A., Kitayama S., Ueda T., Miki S., Watanabe A., Kaneko S. Generation of highly proliferative, rejuvenated cytotoxic T cell clones through pluripotency reprogramming for adoptive immunotherapy // *Molecular Therapy.* Cell Press, – 2021. – Vol. 29. – № 10. – P. 3027.
287. Gattinoni L., Speiser D.E., Lichterfeld M., Bonini C. T memory stem cells in health and disease // *Nat. Med.* – 2017. – Vol. 23. – № 1. – P. 18–27.
288. Han R., Su L., Cheng L. Advancing Human Vaccine Development Using Humanized Mouse Models // *Vaccines* 2024, Vol. 12, Page 1012. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, – 2024. – Vol. 12. – № 9. – P. 1012.
289. Araki R., Fujimori A., Hamatani K., Mita K., Saito T., Mori M., Fukumura R., Morimyo M., Muto M., Itoh M., Tatsumi K., Abe M. Nonsense mutation at Tyr-4046 in the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit of severe combined immune deficiency mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* The National Academy of Sciences of the USA, – 1997. – Vol. 94. – № 6. – P. 2438–2443.
290. Pearson T., Greiner D.L., Shultz L.D. Humanized SCID Mouse Models for Biomedical Research // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* Springer, Berlin, Heidelberg, – 2008. – Vol. 324. – P. 25–51.
291. Deacon R.M.J. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction // *Nat. Protoc.* Nat Protoc, – 2006. – Vol. 1. – № 1. – P. 118–121.
292. Hudson W.A., Li Q., Le C., Kersey J.H. Xenotransplantation of human lymphoid malignancies is optimized in mice with multiple immunologic defects // *Leukemia* 1998 12:12. Nature Publishing Group, – 1998. – Vol. 12. – № 12. – P. 2029–2033.
293. Tomayko M.M., Reynolds C.P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice // *Cancer Chemother. Pharmacol.* Springer-Verlag, – 1989. – Vol. 24. – № 3. – P. 148–154.
294. Alrhoun S., Sennikov S. 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* 2022, Vol. 14, Page 6173. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, – 2022. – Vol. 14. – № 24. – P. 6173.
295. Li X., Zhang X., Yin S., Nie J. Challenges and prospects in HER2-positive breast cancer-targeted therapy // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* Elsevier, – 2025. – Vol. 207. – P. 104624.
296. Canonici A., Ivers L., Conlon N.T., Pedersen K., Gaynor N., Browne B.C., O'Brien N.A., Gullo G., Collins D.M., O'Donovan N., Crown J. HER-targeted tyrosine kinase inhibitors enhance response to trastuzumab and pertuzumab in HER2-positive breast cancer // *Invest. New Drugs.* Springer New York LLC, – 2019. – Vol. 37. – № 3. – P. 441–451.
297. Stanowicka-Grada M., Senkus E. Anti-HER2 Drugs for the Treatment of Advanced HER2 Positive Breast Cancer // *Curr. Treat. Options Oncol.* Curr Treat Options Oncol, – 2023. – Vol. 24. – № 11. – P. 1633–1650.
298. Wang L., Wang Y., Li Y., Zhou L., Du J., Wang J., Liu S.H., Cao Y., Li Y., Yang W., Zhu T. Resistance mechanisms and prospects of trastuzumab // *Front. Oncol.* Frontiers Media SA, – 2024. – Vol. 14. – P. 1389390.
299. Golikova E.A., Alshevskaya A.A., Alrhoun S., Sivitskaya N.A., Sennikov S. V. TCR-T cell therapy: current development approaches, preclinical evaluation, and perspectives on regulatory challenges // *J. Transl. Med.* – 2024. – Vol. 22. – № 1. – P. 897.
300. Shafer P., Kelly L.M., Hoyos V. Cancer Therapy With TCR-Engineered T Cells: Current Strategies, Challenges, and Prospects // *Front. Immunol.* Frontiers Media S.A., – 2022. – Vol. 13. – P. 835762.
301. Tie Y., Tang F., Wei Y. quan, Wei X. wei. Immunosuppressive cells in cancer: mechanisms and potential therapeutic targets // *J. Hematol. Oncol.* J Hematol Oncol, – 2022. – Vol. 15. – № 1.
302. Gupta M.K., Gouda G., Vadde R. Role of the Tumor Microenvironment in Mediating Resistance to Anti-HER2 Antibodies // *Crit. Rev. Oncog.* Crit Rev Oncog, – 2024. – Vol. 29. – № 4. – P. 43–54.
303. Imani S., Farghadani R., Roozitalab G., Maghsoudloo M., Emadi M., Moradi A., Abedi B., Jabbarzadeh Kaboli P. Reprogramming the breast tumor immune microenvironment: cold-to-hot transition for enhanced immunotherapy // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* J Exp Clin Cancer Res, – 2025. – Vol. 44. – № 1.
304. Perrone M., Talarico G., Chiodoni C., Sangaletti S. Impact of Immune Cell Heterogeneity on HER2+ Breast Cancer Prognosis and Response to Therapy // *Cancers (Basel).* Cancers (Basel), – 2021. – Vol.

13. – № 24.
305. Ouyang P., Zhang J., He X., Yang C., Zeng D., Xu D. Infiltration characteristics and regulatory mechanisms of CD8+ T lymphocytes in solid tumors: spatial distribution, biological functions, and interactions with the immune microenvironment // *Front. Immunol. Frontiers Media SA*, – 2025. – Vol. 16. – P. 1661545.
  306. Pherez-Farah A., Boncompagni G., Chudnovskiy A., Pasqual G. The Bidirectional Interplay between T Cell–Based Immunotherapies and the Tumor Microenvironment // *Cancer Immunol. Res. American Association for Cancer Research Inc.*, – 2025. – Vol. 13. – № 4. – P. 463–475.
  307. Kunert A., Chmielewski M., Wijers R., Berrevoets C., Abken H., Debets R. Intra-tumoral production of IL18, but not IL12, by TCR-engineered T cells is non-toxic and counteracts immune evasion of solid tumors // *Oncoimmunology. Taylor & Francis*, – 2018. – Vol. 7. – № 1.
  308. Wei F., Cheng X.X., Xue J.Z., Xue S.A. Emerging Strategies in TCR-Engineered T Cells // *Front. Immunol. Frontiers Media S.A.*, – 2022. – Vol. 13. – P. 850358.
  309. Saiki R.K., Walsh P.S., Levenson C.H., Erlich H.A. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. // *Proceedings of the National Academy of Sciences. Proceedings of the National Academy of Sciences*, – 1989. – Vol. 86. – № 16. – P. 6230–6234.
  310. Ichikawa J., Yoshida T., Isser A., Laino A.S., Vassallo M., Woods D., Kim S., Oelke M., Jones K., Schneck J.P., Weber J.S. Rapid expansion of highly functional antigen-specific t cells from patients with melanoma by nanoscale artificial antigen-presenting cells // *Clinical Cancer Research. American Association for Cancer Research Inc.*, – 2020. – Vol. 26. – № 13. – P. 3384–3396.
  311. Zhang B., Ren Z., Zhao J., Zhu Y., Huang B., Xiao C., Zhang Y., Deng J., Mao L., Tang L., Lan D., Gao L., Zhang H., Chen G., Luo O.J. Global analysis of HLA-A2 restricted MAGE-A3 tumor antigen epitopes and corresponding TCRs in non-small cell lung cancer // *Theranostics. Ivyspring International Publisher*, – 2023. – Vol. 13. – № 13. – P. 4449–4468.
  312. Bethune M.T., Li X.H., Yu J., McLaughlin J., Cheng D., Mathis C., Moreno B.H., Woods K., Knights A.J., Garcia-Diaz A., Wong S., Hu-Lieskovan S., Puig-Saus C., Cebon J., Ribas A., Yang L., Witte O.N., Baltimore D. Isolation and characterization of NY-ESO-1-specific T cell receptors restricted on various MHC molecules // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, – 2018. – Vol. 115. – № 45. – P. E10702–E10711.
  313. Valkiers S., de Vrij N., Gielis S., Verbandt S., Ogunjimi B., Laukens K., Meysman P. Recent advances in T-cell receptor repertoire analysis: Bridging the gap with multimodal single-cell RNA sequencing // *ImmunoInformatics. Elsevier*, – 2022. – Vol. 5. – P. 100009.
  314. Pai J.A., Satpathy A.T. High-throughput and single-cell T cell receptor sequencing technologies // *Nature Methods 2021 18:8. Nature Publishing Group*, – 2021. – Vol. 18. – № 8. – P. 881–892.
  315. De Simone M., Rossetti G., Pagani M. Single cell T cell receptor sequencing: Techniques and future challenges // *Front. Immunol. Frontiers Media S.A.*, – 2018. – Vol. 9. – № JUL. – P. 384005.
  316. Lu Y.C., Zheng Z., Robbins P.F., Tran E., Prickett T.D., Gartner J.J., Li Y.F., Ray S., Franco Z., Bliskovsky V., Fitzgerald P.C., Rosenberg S.A. An Efficient Single-Cell RNA-Seq Approach to Identify Neoantigen-Specific T Cell Receptors // *Molecular Therapy. Cell Press*, – 2018. – Vol. 26. – № 2. – P. 379–389.
  317. Muhowski E.M., Rogers L.M. Dual TCR-Expressing T Cells in Cancer: How Single-Cell Technologies Enable New Investigation // *Immunohorizons. Oxford Academic*, – 2023. – Vol. 7. – № 5. – P. 299–306.
  318. Li Z., Ma L., Gao Z., Wang X., Che X., Zhang P., Li Y., Zhang Q., Liu T., Sun Y., Bai Y., Deng H. Identification and validation of tumor-specific T cell receptors from tumor infiltrating lymphocytes using tumor organoid co-cultures // *Cancer Immunology, Immunotherapy. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH*, – 2024. – Vol. 73. – № 9. – P. 1–13.
  319. Pang Z., Lu M. man, Zhang Y., Gao Y., Bai J. jin, Gu J. ying, Xie L., Wu W. zhong. Neoantigen-targeted TCR-engineered T cell immunotherapy: current advances and challenges // *Biomarker Research 2023 11:1. BioMed Central*, – 2023. – Vol. 11. – № 1. – P. 1–27.
  320. Han A., Glanville J., Hansmann L., Davis M.M. Linking T-cell receptor sequence to functional phenotype at the single-cell level // *Nat. Biotechnol. Nature Publishing Group*, – 2014. – Vol. 32. – № 7. – P. 684–692.
  321. Fuchsl F., Untch J., Kavaka V., Zuleger G., Braun S., Schwanzer A., Jarosch S., Vogelsang C., de Andrade Krätzig N., Gosmann D., Öllinger R., Giansanti P., Hiltensperger M., Rad R., Busch D.H., Beltrán E., Bräunlein E., Krackhardt A.M. High-resolution profile of neoantigen-specific TCR

- activation links moderate stimulation to increased resilience of engineered TCR-T cells // *Nature Communications* 2024 15:1. Nature Publishing Group, – 2024. – Vol. 15. – № 1. – P. 1–19.
322. Newell E.W., Sigal N., Bendall S.C., Nolan G.P., Davis M.M. Cytometry by Time-of-Flight Shows Combinatorial Cytokine Expression and Virus-Specific Cell Niches within a Continuum of CD8 + T Cell Phenotypes // *Immunity*. Immunity, – 2012. – Vol. 36. – № 1. – P. 142–152.
  323. Smith N.P., Ruiter B., Virkud Y. V., Tu A.A., Monian B., Moon J.J., Christopher Love J., Shreffler W.G. Identification of antigen-specific TCR sequences based on biological and statistical enrichment in unselected individuals // *JCI Insight*. American Society for Clinical Investigation, – 2021. – Vol. 6. – № 13.
  324. Chen L., Dong L., Ma Y., Wang J., Qiao D., Tian G., Wang M. An efficient method to identify virus-specific TCRs for TCR-T cell immunotherapy against virus-associated malignancies // *BMC Immunol*. BioMed Central Ltd, – 2021. – Vol. 22. – № 1. – P. 1–10.
  325. Want M.Y., Bashir Z., Najar R.A. T Cell Based Immunotherapy for Cancer: Approaches and Strategies // *Vaccines* 2023, Vol. 11, Page 835. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, – 2023. – Vol. 11. – № 4. – P. 835.
  326. Stubbington M.J.T., Lönnberg T., Proserpio V., Clare S., Speak A.O., Dougan G., Teichmann S.A. T cell fate and clonality inference from single-cell transcriptomes // *Nat. Methods*. Nature Publishing Group, – 2016. – Vol. 13. – № 4. – P. 329–332.
  327. Ferizi M., Aneja M.K., Balmayor E.R., Badiyan Z.S., Mykhaylyk O., Rudolph C., Plank C. Human cellular CYBA UTR sequences increase mRNA translation without affecting the half-life of recombinant RNA transcripts // *Sci. Rep*. Nature Publishing Group, – 2016. – Vol. 6.
  328. Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis - PubMed [Electronic resource]. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7522962/> (accessed: 27.05.2025).
  329. Tran E., Robbins P.F., Lu Y.-C., Prickett T.D., Gartner J.J., Jia L., Pasetto A., Zheng Z., Ray S., Groh E.M., Kriley I.R., Rosenberg S.A. T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer // *New England Journal of Medicine*. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS), – 2016. – Vol. 375. – № 23. – P. 2255–2262.
  330. Lanitis E., Dangaj D., Hagemann I.S., Song D.G., Best A., Sandaltzopoulos R., Coukos G., Powell D.J. Primary Human Ovarian Epithelial Cancer Cells Broadly Express HER2 at Immunologically-Detectable Levels // *PLoS One*. Public Library of Science, – 2012. – Vol. 7. – № 11.
  331. Nishimura T., Iwakabe K., Sekimoto M., Ohmi Y., Yahata T., Nakui M., Sato T., Habu S., Tashiro H., Sato M., Ohta A. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo // *Journal of Experimental Medicine*. J Exp Med, – 1999. – Vol. 190. – № 5. – P. 617–627.
  332. Robbins P.F., Kassim S.H., Tran T.L.N., Crystal J.S., Morgan R.A., Feldman S.A., Yang J.C., Dudley M.E., Wunderlich J.R., Sherry R.M., Kammula U.S., Hughes M.S., Restifo N.P., Raffeld M., Lee C.-C.R., Li Y.F., El-Gamil M., Rosenberg S.A. A Pilot Trial Using Lymphocytes Genetically Engineered with an NY-ESO-1–Reactive T-cell Receptor: Long-term Follow-up and Correlates with Response // *Clinical Cancer Research*. – 2015. – Vol. 21. – № 5. – P. 1019–1027.
  333. Park J.R., DiGiusto D.L., Slovak M., Wright C., Naranjo A., Wagner J., Meechoovet H.B., Bautista C., Chang W.C., Ostberg J.R., Jensen M.C. Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma // *Molecular Therapy*. Mol Ther, – 2007. – Vol. 15. – № 4. – P. 825–833.
  334. Koido S., Homma S., Okamoto M., Takakura K., Gong J., Sugiyama H., Ohkusa T., Tajiri H. Chemoimmunotherapy targeting Wilms' tumor 1 (WT1)-specific cytotoxic T lymphocyte and helper T cell responses for patients with pancreatic cancer // *Oncoimmunology*. Bellwether Publishing, Ltd., – 2014. – Vol. 3. – № 10. – P. e958950-1-e958950-3.